



Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología celular

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad Pablo de Olavide

Tesis Doctoral

Activación del complejo NLRP3-  
Inflamasoma como posible factor  
etiopatogénico de la Depresión Mayor

Elisa Isabel Alcocer Gómez

Sevilla, 2015





Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

Facultad de Ciencias Experimentales

Universidad Pablo de Olavide

# Activación del complejo NLRP3-Inflamasoma como posible factor etiopatogénico de la Depresión Mayor

Memoria de tesis presentada por Elisa Isabel Alcocer Gómez, Licenciada  
en Psicología por la Universidad de Sevilla, para optar al GRADO DE  
DOCTOR

Los directores

José Antonio Sánchez Alcázar

Ángel Manuel Carrión Rodríguez

Sevilla, a 6 de Noviembre de 2015







**D. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ ALCÁZAR**, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Y

**D. ÁNGEL MANUEL CARRIÓN RODRÍGUEZ**, DOCTOR EN BIOLOGIA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMAN

Que **Doña Elisa Isabel Alcocer Gómez**, Licenciada en Psicología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Activación del complejo NLRP3-Inflamasoma como posible factor etiopatogénico de la Depresión Mayor” y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Para que conste, firman la presente en Sevilla, a 6 de Noviembre de 2015

Dr. José Antonio Sánchez Alcázar

Dr. Ángel Manuel Carrión Rodríguez



**Al amor de mi vida,  
a mis padres..., a ti.**



# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1. La depresión mayor: Criterios diagnósticos, incidencia, prevalencia, coste socioeconómico y comorbilidad con el suicidio	7
1.2. Las monoaminas en la depresión	10
1.3. Influencias genéticas en el TDM	15
1.4. Alteraciones cerebrales estructurales y funcionales en el TDM	18
1.5. Neurotrofinas y depresión	18
1.6. Las hormonas del estrés y la depresión mayor	20
1.7. Las hipótesis glutamatérgicas y gabaérgicas de la depresión	21
1.8. Disfunción mitocondrial, estrés oxidativo/nitrosidativo e inflamación en la depresión	22
1.8.1. Sobre la mitocondria y la disfunción mitocondrial	23
1.8.2. Disfunción metabólica mitocondrial en el TDM	27
1.8.2.1. La presencia de alteraciones psiquiátricas en personas con deficiencias mitocondriales	27
1.8.2.2. Anormalidades bioenergéticas detectadas por neuroimagen en el trastorno depresivo	31
1.8.2.3. Pruebas genéticas del deterioro mitocondrial en el TDM	33
1.8.2.4. Evidencias encontradas en estudios histológicos humanos sobre la implicación de las alteraciones metabólicas en el TDM	35
1.8.2.5. Modelos animales para detectar anomalías mitocondriales en la depresión	36
1.8.3. Estrés oxidativo y nitrosidativo en el trastorno depresivo mayor	38
1.8.3.1. Los antioxidantes y las enzimas antioxidantes en el TDM	39
1.8.3.2. Los radicales libres en la depresión mayor	42
1.8.3.3. Daños por OS& NS en la depresión mayor	43
1.8.3.3.1. Daños por OS& NS en la depresión mayor	44
1.8.3.3.2. El daño al ADN en la depresión	44
1.8.3.3.3. Daños nitrosativos a las proteínas en la depresión	45
1.8.3.4. Respuestas autoinmunes contra neoepítomos formados por daños a los ácidos grasos de las membranas y a las proteínas	46
1.8.3.4.1. El aumento de anticuerpos contra LDL oxidado	46
1.8.3.4.2. El aumento de las respuestas de IgM a los de ácidos grasos de la membrana en el TDM	46
1.8.3.4.3. El aumento de los anticuerpos IgM contra neoepítomos nitrados en suero de pacientes deprimidos	47
1.8.3.5. El polimorfismo en los genes de OS y NS en la depresión	48
1.8.4. Inflamación y activación del complejo NLRP3-inflamasoma en el TDM	49
1.8.4.1. Inflamación y citoquinas inflamatorias en el TDM	49
1.8.4.2. Activación de la microglía en el TDM	56
1.8.4.3. Activación del complejo NLRP3-Inflamasoma en el TDM	59
<b>2. Objetivos</b>	<b>63</b>
<b>3. Material y Métodos</b>	<b>69</b>
3.1. Pacientes	69
3.2. Evaluación de los pacientes	71

3.3. Fármacos y reactivos-----	72
3.4. Líneas celulares-----	73
3.5. Muestras de sangre-----	73
3.6. Aislamiento de PBMC mediante Ficoll-PaqueTM PLUS-----	73
3.7. Animales para ensayos <i>in vivo</i> -----	74
3.8. Pruebas para la determinación del comportamiento depresivo en animales-----	75
3.8.1. Modelo de Restraint stress (RS)-----	75
3.8.2. Prueba de natación forzada-----	76
3.8.3. Interacción social-----	77
3.8.4. Test de consumo de sacarosa-----	78
3.8.5. Consumo de alimentos-----	78
3.9. Análisis de proteínas mediante Western-Blot-----	79
3.9.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford-----	79
3.9.2. SDS-Page y Western-Blot-----	79
3.9.3. Inmunodetección con anticuerpos-----	80
3.10. Niveles IL-1 $\beta$ e IL-18-----	81
3.11. Niveles de ATP-----	82
3.12. Producción mitocondrial de ROS-----	82
3.13. Determinación de la peroxidación lipídica-----	83
3.14. Extracción de ARN-----	84
3.15. Tratamiento con DNAsa-----	85
3.16. PCR en tiempo real-----	85
3.17. Determinación de los niveles de serotonina-----	86
3.18. Inmunohistoquímica y análisis histológico-----	87
3.19. Análisis Estadístico-----	89
<b>4. Resultados-----</b>	<b>93</b>
<b>PARTE 1: Activación del complejo NLRP3-inflamasoma en el TDM-----</b>	<b>93</b>
4.1. El complejo NLRP3 inflamasoma se activa en PBMC de pacientes con TDM-----	94
4.2. La amitriptilina reduce la activación del inflamasoma NLRP3 en los pacientes con TDM-----	99
4.3. El estrés oxidativo en PBMC de pacientes con TDM-----	100
<b>PARTE 2: Implicación del complejo inflamasoma en la depresión inducida por estrés-----</b>	<b>103</b>
4.4. La delección de NLRP3 protege del comportamiento depresivo inducido por estrés-----	103
4.5. El RS induce la activación de NLRP3-inflamasoma en el córtex prefrontal e hipocampo-----	105
4.6. La delección de NLRP3 previene de la activación de la microglía e inhibición de la neurogénesis inducida por RS-----	107
4.7. La inhibición de la microglía previene del comportamiento depresivo y activación del inflamasoma inducidos por RS-----	112
<b>PARTE 3: Efecto de los fármacos antidepresivos en la activación del complejo inflamasoma-----</b>	<b>118</b>

4.8. Los antidepresivos inhiben la activación del NLRP3-inflamasoma en modelos in vitro-----	118
4.9. Los antidepresivos inhiben la activación del NLRP3-inflamasoma en modelos in vivo y pacientes con TDM-----	122
<b>5. Discusión-----</b>	<b>127</b>
<b>6. Conclusiones-----</b>	<b>139</b>
<b>7. Bibliografía-----</b>	<b>143</b>
<b>8. Producción-----</b>	<b>195</b>
<b>ANEXOS-----</b>	<b>197</b>

## RESUMEN

El trastorno depresivo mayor (TDM) es la enfermedad mental más prevalente y un importante problema de salud en la sociedad actual. Aunque su epidemiología, síntomas y complicaciones han sido ampliamente documentados, su etiología y fisiopatología permanecen aún sin dilucidar. En las dos últimas décadas, se ha recopilado una amplia evidencia que apoya el papel de la inflamación como posible factor etiológico de la depresión mayor. Además, se ha mostrado repetidamente que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias están elevados en personas diagnosticadas de TDM, entre ellas, las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se producen estos procesos inflamatorios aún no están claros. En los últimos años, las IL-1 $\beta$  e IL-18 han adquirido mucha relevancia por su implicación en diversas patologías y su relación con algunas caspasas implicadas en la inflamación y la apoptosis, como es el caso de la caspasa-1. Precisamente las IL-1 $\beta$  e IL-18, son las principales citoquinas activadas por un nuevo sistema inflamatorio conocido como complejo NLRP3-Inflamasoma, un complejo protéico considerado como un sensor de estrés intracelular, cuya activación es responsable de la inflamación sistémica. En este sentido, en el presente estudio hemos investigado la posible implicación del complejo NLRP3-Inflamasoma (inflammasoma) en la fisiopatología del TDM, examinado un aspecto novedoso en relación a los procesos de inmuno-inflamación en la respuesta de estrés y la depresión, y es el hecho de que el complejo NLRP3-Inflamasoma pueda constituir un puente entre el estrés psicológico y la depresión. Además, hemos analizado la posibilidad de que la modulación de este complejo pueda convertirse en un objetivo clave en el tratamiento de este trastorno, así como en un biomarcador para evaluar la respuesta al tratamiento antidepresivo en pacientes con TDM. Para ello, hemos trabajado en primer lugar con una muestra de pacientes con TDM tratados y no tratados con el antidepresivo amitriptilina. Los



resultados han mostrado que el complejo NLRP3-Inflamasoma se encuentra activado en pacientes con TDM, puesto de manifiesto por niveles elevados de la expresión de proteína y ARNm de NLRP3 y Caspasa-1 en células mononucleares de la sangre de los pacientes y por niveles séricos elevados de IL-1 $\beta$  e IL-18. Además, hemos encontrado que los niveles de estas citoquinas correlacionan positivamente con los síntomas depresivos, medidos mediante el Inventario de Depresión de Beck (BDI). Los niveles de estrés oxidativo también se han encontrado elevados en estos pacientes. El tratamiento con amitriptilina redujo la activación del inflamasoma en los pacientes, pero no los niveles de estrés oxidativo, llevándonos a pensar que tenía que existir una vía alternativa para la activación de este complejo en el TDM que quizás podría ser el estrés psicológico. En este sentido, en una segunda parte de nuestro estudio, hemos trabajado con un modelo animal (ratón) de depresión inducida por estrés, y los resultados han mostrado que NLRP3-Inflamasoma está implicado en la depresión producida como consecuencia del estrés crónico. Nuestro trabajo ha mostrado que en ausencia de NLRP3 inflamasoma, el estrés prolongado no provoca comportamientos depresivos, ni activación microglial, ni disminución de la neurogénesis del hipocampo. En una tercera parte de nuestro estudio, hemos evaluado el efecto que ciertos fármacos antidepresivos, utilizados normalmente en la práctica clínica, tienen en la modulación de la activación del inflamasoma, tanto en un modelo invitro de células THP-1 estimuladas por ATP, como en un modelo de ratón de depresión inducida por estrés, como en una muestra de pacientes con TDM. Los resultados han mostrado que los antidepresivos producían una reducción de la activación del inflamasoma manifestada a través de una disminución de la expresión protéica y de ARNm de NLRP3 y de IL-1 $\beta$  (p17), y de una disminución de los niveles séricos de IL-1 $\beta$  y IL-18. Además, se ha observado una interesante correlación negativa entre los niveles de IL-1 $\beta$  y los niveles de serotonina en los pacientes tratados.

Estos resultados proporcionan una nueva comprensión de la patogénesis del TDM y señalan al inflamasoma como un posible objetivo para nuevas intervenciones terapéuticas para esta enfermedad.

**ABREVIATURAS**

**5-HT:** Serotonina

**8-OHdG:** 8-hidroxi-2 'desoxiguanosina

**ADNmt:** ADN mitocondrial

**ADNn:** ADN nuclear

**ADP:** Adenosíndifosfato

**AMP:** Adenosina monofosfato

**ATC:** Antidepresivo tricíclico

**BDI:** Inventario de depresión de Beck

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro

**CoQ<sub>10</sub>:** Coenzima Q<sub>10</sub>

**COX-2:** ciclooxigenasa- 2

**CPEO:** Oftalmoplejía externa progresiva dominante

**Cu/ZnSOD:** Cobre/zinc superóxidodismutasa

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina

**DA:** Dopamina

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daños

**DCX:** Doblecortina

**DM1:** Distrofia miotónica tipo 1

**DSM-V:** Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales Quinta Edición

**FDG:** Fluorodesoxi-glucosa

**GPX:** Glutationperoxidasa

**GWAS:** Estudios de asociación de genoma completo

Elisa Isabel Alcocer Gómez

**HP:** Hipocampo

**HPA:** Eje hipotálamo-hipófisis adrenal

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**IBD:** Enfermedad inflamatoria intestinal

**IFN:** Interferón

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico 1

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IMAOs:** Inhibidores de la monoaminoxidasa

**iNOS:** Enzima sintetasa inducible de NO

**IRSN:** Inhibidor de la recaptación de la serotonina y noradrenalina

**ISRS:** Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

**LES:** Lupus eritematoso sistémico

**LPO:** Lipoperoxidación

**LPS:** Lipopolisacárido

**LRR:** Leucine Rich Region

**MDA:** Malondialdehído

**MELAS:** Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y accidente

**MnSOD:** Manganese superóxidodismutasa

**MRS:** Espectrometría de resonancia magnética

**mtNOS:** Óxido nítrico sintasa mitocondrial

**NA:** Noradrenalina

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso

**NLR:** Receptor Nod-like

**NMDA:** N-glutamato N-metil-D-aspartato

**NO:** Óxido nítrico

**NS:** Estrés nitrosidativo

**NT-3:** Neurotrofina 3

**NT-4:** Neurotrofina 4

**NTP:** Trifosfato beta-nucleósido

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPI:** Índice de potencial oxidativo

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PCR:** Proteína C-reactiva

**PET:** Tomografía por emisión de positrones

**PFC:** Cortex prefrontal

**PI:** Fosfatidilinositol

**PME:** Fosfomonoéster

**PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados

**RA:** Artritis reumatoide

**RS:** Restraint stress

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**TAC:** Capacidad antioxidante total

**TBARS:** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TDM:** Trastorno depresivo mayor

Elisa Isabel Alcocer Gómez

**TEC:** Terapia electroconvulsiva

**TeCA:** Antidepresivo tetracíclico

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TH:** Tirosina Hidroxilasa

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TrK:** Tirosina kinasa

**XO:** Xantina oxidasa

# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La depresión mayor: Criterios diagnósticos, incidencia, prevalencia, coste socioeconómico y comorbilidad con el suicidio.

Según el DSM-V (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales Quinta Edición, 2013), el trastorno depresivo mayor (TDM) se caracteriza por la presencia en el sujeto que la padece de un estado de ánimo deprimido (triste, abatido, decaído) y/o por la pérdida de interés o incapacidad de experimentar placer en casi todas las actividades de la vida cotidiana. Unidos a estos síntomas, aparecen otros como los sentimientos de desesperanza y pesimismo, sentimientos de culpa y de inutilidad, alteraciones del sueño, alteraciones del apetito, disminución de la energía, agitación o enlentecimiento motor, problemas de concentración o toma de decisiones, e ideas recurrentes de suicidio. Para que la persona sea diagnosticada de TDM, ha de presentar casi diariamente al menos cinco de estos síntomas, con la consiguiente interferencia en su funcionamiento cotidiano (Tabla 1).

**Tabla 1. Criterios diagnósticos del TDM según el DSM-V**

- A. Cinco (o más) de los síntomas siguientes han estado presentes durante el mismo período de dos semanas y representan un cambio de funcionamiento previo; al menos uno de los síntomas es (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o de placer.
- (1) Estado de ánimo deprimido la mayor parte del día, casi todos los días, según se desprende de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas.
- (2) Disminución importante del interés o el placer por todas o casi todas las actividades la mayor parte del día, casi todos los días (como se desprende de la información subjetiva o de la observación)
- (3) Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso, o disminución del apetito casi todos los días
- (4) Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
- (5) Agitación o retraso psicomotor casi todos los días.
- (6) Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
- (7) Sentimiento de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que puede ser delirante) casi todos los días (no simplemente el autorreproche o culpa por estar enfermo).
- (8) Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (a partir de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas).
- (9) Pensamientos de muerte recurrentes (no solo miedo a morir), ideas suicidas recurrentes sin un plan determinado, intento de suicidio o un plan específico para llevarlo a cabo.
- B. Los síntomas causan malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento.
- C. El episodio no se puede atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia o de otra afección médica.
- D. El episodio de depresión mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, u otro trastorno especificado o no especificado del espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos
- E. Nunca ha habido un episodio maníaco o hipomaníaco.

**Fuente:** *American Psychiatric Association. DSM-V*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la depresión mayor como el más común de los trastornos mentales. Calcula que afecta a 121 millones de personas en todo el mundo y advierte que una de cada cinco personas llegará a desarrollar un cuadro depresivo a lo largo de su vida (WHO, 2007). Además, se prevé que en el 2020 se convierta en la segunda causa más común de discapacidad, situándose justo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (Murray et al., 1997). Aunque las estimaciones sobre su prevalencia varían dependiendo de la definición de caso y del tipo de instrumento utilizado, se acepta que entre un 2-15% de los individuos padecerán a lo largo de su vida una depresión mayor (WHO, 2000). Según los datos del estudio epidemiológico ESEMeD, realizado sobre una muestra representativa de la población, en diferentes países europeos, entre los que se incluye España, la TDM presenta en nuestro país una

prevalencia-vida del 10,5% y una prevalencia-año del 3,9% (Haro et al., 2006). Estos datos concuerdan con los obtenidos en este mismo estudio para el conjunto de la población europea que muestra una prevalencia-vida del 12,5% y una prevalencia-año del 3,9% (Alonso et al., 2004 a). Además, algunos estudios de seguimiento realizados informan de que el trastorno depresivo recurre (Kruijshaar et al., 2005) y puede cronificarse en el 20-25% de los casos (Alonso et al., 2005; Gilmer et al., 2005).

Respecto a la carga económica que ocasiona el trastorno, debemos subrayar que el TDM afecta no sólo al paciente, sino al conjunto de la sociedad ya que el impacto económico que origina en la comunidad va más allá de los gastos directos relacionados con el uso de los recursos sanitarios. Esta enfermedad repercute en el rendimiento laboral de las personas que la padecen y conlleva elevados costes indirectos que se derivan de la pérdida de productividad y del absentismo laboral (Ayuso, 2003; Knapp, 2003). En un estudio realizado sobre el coste económico de la depresión en Europa (Sobochi et al., 2006), se ha estimado el coste total en 118 millones de euros, de los cuales la mayor parte se debe a los costes indirectos ocasionados por pérdidas de productividad y por bajas laborales (61%). Distribuyéndose el resto entre cuidados ambulatorios (19%), hospitalizaciones (9%), tratamientos farmacológicos (8%) y mortalidad (3%). En lo que se refiere a la carga económica en España, los estudios arrojan un gasto de 5.005 millones de euros anuales, con una distribución muy parecida a la europea: 71% costes indirectos y 29% costes directos (Sobocki et al., 2006).

Otro aspecto importante a señalar es que el TDM es uno de los factores más relacionados con la conducta suicida (Bernal et al., 2007). Un reciente estudio, pone de manifiesto que el 48% de los pacientes deprimidos tienen ideación suicida y que de estos, el 24% han llevado a cabo algún intento de suicidio, con la peculiaridad de que en ningún momento informaron sobre recibir o sobre la necesidad de recibir algún tipo de tratamiento (Pagura

et al., 2009). La OMS ha determinado que alrededor de 58.000 personas se suicidan al año en la UE, cifra que supera la de muertes anuales por accidentes de tráfico u homicidios. Los estudios en los que se realizan autopsias verbales de los fallecidos por suicidio (entrevistas realizadas a familiares y médicos de cabecera de los fallecidos) demuestran que la depresión es el antecedente principal en el 30-45% de los suicidios consumados (Ayuso, 2004).

En lo que respecta a las causas de la enfermedad, hay que señalar que son desconocidas, aunque todo apunta a que existe una interacción de factores biológicos, psicológicos y sociales. Desde el punto de vista biológico, son varias las aproximaciones que intentan esclarecer la etiología y la fisiopatología de esta enfermedad, a continuación haremos una breve descripción de las más aceptadas hasta la fecha.

## **1.2. Las monoaminas en la depresión.**

El hecho de que la mayoría de las neuronas noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas están localizadas en el cerebro medio y en los núcleos del tronco cerebral y que desde allí proyectan hacia casi la totalidad del cerebro, sugiere que los sistemas monoaminérgicos están implicados en la regulación de una dilatada gama de funciones cerebrales entre las que se encuentran, la atención, el sueño, el apetito, la cognición y el estado de ánimo. La investigación en esta área ha mostrado que casi cualquier compuesto que actúe elevando las concentraciones de monoaminas en la hendidura sináptica, ya sea aumentando su producción, o inhibiendo su recaptación o su degradación, es un efecto antidepressivo clínicamente eficaz (Belmaker et al., 2008). Estas observaciones han llevado al desarrollo de la teoría de la depresión farmacológicamente más relevante que se la conoce como la hipótesis monoaminérgica. Las monoaminas son el grupo principal de neurotransmisores del sistema nervioso. Dentro de las monoaminas podemos

distinguir dos grupos. Uno sería el grupo de las catecolaminas (derivadas del aminoácido tirosina), en este grupo se incluyen principalmente la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA). Y el otro es el grupo de las indolaminas (derivadas del aminoácido triptófano) en el que se incluye la serotonina (5-HT).

Estas primeras hipótesis biológicas de la depresión se centraron principalmente en los neurotransmisores NA y 5-HT, conociéndose como la hipótesis de la deficiencia catecolamínica (Schildkraut, 1965; Bunney et al., 1965) y la hipótesis de la deficiencia indolamínica (Coppin, 1967; Lapin y Oxenkrug, 1969), respectivamente.

**La hipótesis catecolamínica** postula que la depresión sería el resultado de un déficit central de NA, mientras que la manía podría deberse a un exceso cerebral de este neurotransmisor. Esta hipótesis se basa en la observación de que ciertos fármacos con efecto estimulante-antidepresivo como las anfetaminas, el salbutamol, los antidepresivos tricíclicos, etc, ejercen un efecto activador de la NA y producen un aumento de la concentración sináptica de este transmisor, mientras que otros compuestos que reducen la NA, como la reserpina, provocan síntomas depresivos.

**La hipótesis indolamínica** hace referencia a un déficit cerebral de 5-HT como responsable de la depresión. Esta hipótesis se fundamenta en los hallazgos de la utilización del fármaco reserpina como antihipertensivo. Este alcaloide, vaciaba los depósitos interneuronales de serotonina, provocando depresión en un porcentaje elevado de pacientes hipertensos (Goodwin et al., 1971). Además, los fármacos que aumentaban la concentración sináptica de serotonina como la 5- hidroxitriptamina, el L- triptófano, los antidepresivos tricíclicos y los IMAOS (inhibidores de la monoaminoxidasa) producían una mejoría de la sintomatología depresiva. En un principio esta hipótesis serotoninérgica fue postulada sin una clara demostración de correlatos neurobioquímicos

centrales (Coppen, 1967), sino más bien basándose en estudios de variables relacionadas con la disfunción serotoninérgica periférica plaquetaria (Van Praag, 2006). Fue con la aparición de técnicas más modernas, con las que se produjo la extrapolación de esta hipótesis al funcionamiento del sistema nervioso central, y fue entonces cuando Carlsson y sus colaboradores describieron cómo los antidepresivos tricíclicos bloqueaban la captación cerebral de serotonina (Carlsson et al., 1968), permitiendo de esta forma que Lapin y su equipo (Lapin et al., 1969) postularan de forma definitiva la teoría serotoninérgica de la depresión frente a la hipótesis catecolaminérgica, argumentando que un déficit de serotonina intersináptico en ciertas regiones cerebrales se encontraba detrás de los síntomas depresivos. Posteriormente, se constataría que los antidepresivos tricíclicos y la terapia electroconvulsiva aumentaban la eficiencia de la transmisión serotoninérgica, principalmente la mediada por los receptores 5HT-1A, ya sea por sensibilización de los receptores post-sinápticos, ya sea por desensibilización de los receptores presinápticos, que de forma habitual producen una reducción de la liberación de serotonina en la hendidura sináptica, u ocasionan una inhibición de la frecuencia en la tasa de descarga de las neuronas serotoninérgicas (Blier et al., 1994). Con todos estos hallazgos, se concluyó que la disminución de la concentración sináptica de serotonina en ciertas regiones del cerebro, es una de las causas bioquímicas de los trastornos depresivos.

A pesar del gran avance que supusieron estas teorías monoaminérgicas para el estudio de la etiopatogenia de la depresión y del mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos, pronto se empezó a plantear que estas hipótesis sólo representarían una pequeña parte en relación al funcionamiento de estos psicofármacos. De esta manera surgió **la hipótesis de los cambios adaptativos de los receptores**, en los años ochenta que postula que el agotamiento de los receptores monoaminérgicos en la depresión

conduciría a una regulación compensatoria en la funcionalidad y/o en el número de sus receptores (Sulser et al., 1978), (Charney et al., 1981), (Henninger et al., 1987).

Los receptores de serotonina que más se han estudiado en relación con la depresión son los 5 HT-1A y los 5HT-2A. A pesar de las controversias existentes entre los distintos estudios, en líneas generales, argumentan que las personas con depresión muestran alteraciones en los receptores 5HT-1A y 5 HT-2A, o en sus mecanismos de transducción. Estas investigaciones sugieren, con limitaciones, que en el trastorno depresivo existe un incremento de la densidad de los receptores 5 HT-2A (alta regulación) en el córtex frontal (Ferrieret al, 1996; Hrdina PD et al., 1993) y en plaquetas (Bakish D et al., 1997; Serres F et al., 1999), y una disminución de la funcionalidad de los receptores 5HT-1A y 5HT-2A. Las investigaciones sobre la densidad de los receptores 5HT-1A centrales son pocas y arrojan resultados controvertidos (Stahl et al., 1994), pero en conjunto, sugieren que no existen diferencias relevantes en la densidad de estos receptores en la corteza de sujetos depresivos aunque sí un incremento de los receptores presinápticos en los núcleos del rafe. Este incremento de la densidad 5HT-2A en sujetos con depresión, podría interpretarse como un mecanismo compensatorio del déficit de serotonina o de la menor funcionalidad de este receptor en el trastorno depresivo. En lo que respecta a los estudios funcionales hay que subrayar que la aparición de diferencias en sujetos afectos de depresión no han de interpretarse como secundarias a alteraciones en el número o en la estructura de los receptores estudiados únicamente, sino que han de considerarse la existencia de alteraciones en otros puntos de la cascada de acontecimientos que se desencadena tras la estimulación del receptor. De esta forma, alteraciones en los segundos y terceros mensajeros, esto es, en el mecanismo de transducción, podrían producir de la misma manera, modificaciones de la respuesta fisiológica (Duman et al., 1997).

A pesar de que las teorías clásicas de la neurobiología de la depresión se han centrado fundamentalmente en la serotonina y la noradrenalina, ha aparecido un creciente interés en estudiar el papel que puede desarrollar la dopamina (Nutt, 2006). En este sentido se ha observado que ciertos inhibidores de la recaptación de la dopamina, como la nomifensina y ciertos agonistas de los receptores de la dopamina, como el pramiprexol han tenido efectos antidepresivos en pacientes con TDM (Goldberg et al., 2004).

Para finalizar, hay que señalar que aunque estas teorías monoaminérgicas aún siguen vigentes y continúan estudiándose, la observación de la resistencia total o parcial de los pacientes a los fármacos antidepresivos, y el retraso en la aparición de los efectos, sugiere que la disfunción de los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos podría ser sólo una consecuencia de una causa más primaria en la etiología de la depresión mayor. Esto ha dado lugar al desarrollo de nuevas investigaciones y nuevas teorías que atribuyen la fisiopatología de la depresión a diversos factores entre los que se encuentran: una interacción entre los genes y los estresores psicosociales; alteraciones cerebrales estructurales y funcionales en la corteza prefrontal subgenual y el hipocampo; disminución de los factores neurotróficos y de la neurogénesis; desregulación de las hormonas del estrés; alteración glutamatérgica y de la neurotransmisión gabaérgica; y por último, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo/nitrosidativo y la neuroinflamación (Hasler et al.2010).



### 1.3. Influencias genéticas en el TDM.

La depresión mayor, como otras muchas enfermedades, se encuentra dentro del grupo conocido como enfermedades genéticamente complejas, en las que tanto los factores genéticos como los ambientales desempeñan un papel crucial en su etiología.

Los estudios de familia, de gemelos y de adopción proporcionan evidencia muy sólida y consistente de que el TDM es un trastorno familiar y de que esta familiaridad es en su mayoría debida a factores genéticos. Estos estudios muestran que la influencia de los factores genéticos es de alrededor de 30 a 40% (Sullivan et al., 2000). El 60-70% restante son efectos específicos en el individuo de la interacción entre los genes y el ambiente. Estos efectos son en su mayoría eventos adversos ocurridos en la infancia, o acontecimientos estresantes en curso, entre los que se incluyen problemas matrimoniales, divorcios y el bajo apoyo social, entre otros (Kendler et al., 2002, 2006).

En la búsqueda de los genes de riesgo que predisponen a la depresión, los estudios clásicos de ligamiento han favorecido la identificación de regiones cromosómicas de riesgo y, de esta forma, identificar algunos genes candidatos, no sólo por su posición en el genoma sino también por su función. Algunas de estas regiones detectadas son por ejemplo, la región cromosómica 11pter-p15 del cromosoma 11 que contiene genes que se han considerado candidatos para el TDM como es la Tirosina Hidroxilasa (TH), crucial para la síntesis de dopamina (Zubenco et al., 2003), o la región cromosómica 17q11.2, que contiene el gen transportador de serotonina (SLC6A4) (Middeldorp, 2009). Igualmente, los estudios de asociación han descrito que cierto grado de variabilidad genética, asociada fundamentalmente a genes del sistema serotoninérgico, parece estar influyendo en el riesgo para desarrollar la enfermedad y para ciertos aspectos clínicos como la respuesta al tratamiento con antidepresivos (Serretti et al., 2004). A este respecto,

uno de los genes más estudiados ha sido SLC6A4 que codifica para el transportador de serotonina y tiene un polimorfismo (5-HTTLPR) en la zona promotora con dos variantes alélicas: la 484(S) y la 528(L). Estudios llevados a cabo *in vivo* han puesto de manifiesto que la presencia del alelo corto 484 se asocia con una menor expresión del gen, y como consecuencia, con una disminución del número de transportadores de serotonina en la membrana neuronal (Lesch et al., 1996; Heils et al., 1997; Egan et al., 2003). Otros estudios han relacionado la presencia del alelo corto del polimorfismo 5-HTTLRP tanto con la severidad de la depresión (Gutiérrez et al., 1998; Baca et al., 2002) como con una mayor vulnerabilidad para padecer este trastorno cuando se ha sufrido maltrato infantil (Gutiérrez et al., 1998; Kendler et al., 2004; Caspi et al., 2003).

Los estudios de interacción gen-ambiente (GxA), han subrayado la importancia de los factores ambientales en el riesgo para padecer depresión. Aunque el papel de los acontecimientos vitales estresantes a lo largo de la vida como los sentimientos de pérdida, la humillación, la frustración o el maltrato infantil, en el incremento del riesgo de sufrir depresión, ya está ampliamente documentado en la bibliografía (Kendler et al., 1999; Pine et al., 2002), los estudios de interacción GxA han puesto de manifiesto que el impacto de estos acontecimientos adversos sobre la neurobiología del cerebro estaría moderado por cierta variabilidad genética individual (Caspi et al., 2003). De acuerdo con estos estudios, las personas difieren en su sensibilidad a los factores ambientales adversos, de esta manera las personas que son genéticamente vulnerables tendrán más riesgo de padecer depresión cuando se exponen a la misma dosis de cierto factor de riesgo ambiental que las personas que no lo son (van Os et al., 2010). En este sentido, Caspi y colaboradores realizaron un estudio en el que analizaban las interacciones genético-ambientales en la etiología de la depresión mayor y encontraron que los portadores del alelo corto del polimorfismo 5-HTTLPR del gen transportador de serotonina que habían

experimentado sucesos estresantes en su infancia y juventud, manifestaban más síntomas y episodios depresivos y comportamiento suicida a los 26 años (Caspi et al., 2003). Con este estudio, Caspi y su equipo se convirtieron en los primeros en demostrar empíricamente esta interacción gen-ambiente (Caspi et al., 2003), aunque el papel de este polimorfismo sobre el riesgo de padecer depresión todavía está a debate (Risch et al., 2009; Munafo et al., 2009; Sen et al., 2010). El impacto que estos acontecimientos suponen sobre la biología del cerebro se ve moderado por una cierta variabilidad genética individual, de esta manera, la bibliografía señala que tanto el gen que codifica para el transportador de serotonina (Caspi et al., 2003; Kendler et al., 2005) como el que codifica para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Kaufman et al., 2006; Wichers et al., 2008) desempeñan un papel fundamental en la modulación del impacto del maltrato y del riesgo de desarrollar sintomatología depresiva en la edad adulta (Aguilera et al., 2009). En este sentido, las experiencias tempranas adversas podrían alterar el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis adrenal (HPA), además de alterar las respuestas neurobiológicas al estrés en la vida adulta, lo que predispondría al sujeto a padecer depresión (Gelder et al., 2006).

Por su parte, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han abierto una nueva vía en la investigación de la relevancia de los factores genéticos en la etiología de la depresión. Si bien, aunque los resultados obtenidos de los estudios GWAS han permitido identificar algunos posibles genes candidatos para la enfermedad (Shi et al., 2011; Lewis et al., 2010), no han conseguido reproducir la asociación de determinados genes candidatos detectada anteriormente por los estudios clásicos de asociación.

#### **1.4. Alteraciones cerebrales estructurales y funcionales en el TDM.**

El desarrollo de técnicas de neuroimagen ha permitido estudiar las anomalías estructurales y funcionales en la vida de los pacientes deprimidos. Desafortunadamente, debido al pequeño tamaño de las muestras utilizadas y a su heterogeneidad y a la gran variedad de técnicas de imagen utilizadas, se hace difícil identificar de forma consistente regiones neuronales relacionadas con anomalías funcionales o estructurales en el TDM (Fitzgerald et al., 2008). Pese a esto, las anomalías estructurales y funcionales halladas en la corteza cingulada subgenual izquierda, el córtex prefrontal y el hipocampo son los hallazgos neuroanatómicos más sólidos en el TDM (Hercher et al., 2009; Koolschijn et al., 2009; Campbell et al., 2006).

#### **1.5. Neurotrofinas y depresión.**

Los estudios de neuroimagen e histológicos ponen de manifiesto alteraciones estructurales y de la plasticidad sináptica en diferentes regiones cerebrales de los pacientes con TDM. Desde el punto de vista fisiopatológico, estas alteraciones podrían impedir la adecuada adaptación del cerebro a la diferente estimulación ambiental (Duman, 2002). Así, se ha dirigido la atención hacia el papel de las neurotrofinas en la depresión, ya que éstas son factores de supervivencia de las neuronas de vital relevancia para el establecimiento y mantenimiento de los circuitos neurales tanto en la etapa de desarrollo, como en la etapa adulta del individuo (Oliveira et al., 2013; Jiang et al., 2013).

Las neurotrofinas constituyen una familia de cuatro factores de crecimiento distintos: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4 (NT-4). Una vez unidas a los receptores de membrana de las neuronas diana, las neurotrofinas inducen la activación de una cascada intracelular que facilita la supervivencia y los efectos tróficos de la célula.

Cada neurotrofina se une específicamente con alta afinidad a ciertos miembros de la familia de receptores de la tirosina kinasa (TrK). De esta forma, NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4 se unen a TrkB, y NT-3 se une a TrkC con alta afinidad y a TrkA y TrkB con baja afinidad. Adicionalmente, todas las neurotrofinas se unen con baja afinidad a p75 (NTR), un receptor diferente que se encarga del almacenamiento y del transporte de neurotrofinas, además de promover la muerte neuronal para esculpir circuitos neurales durante el desarrollo (Villanueva, 2013).

Las investigaciones realizadas en los últimos años han puesto de manifiesto que el BDNF ejerce un papel fundamental en la patogénesis de la depresión (Dwivedi, 2009; Lee et al., 2010). Estudios preclínicos iniciales realizados con ratas sometidas a estrés crónico, han encontrado niveles disminuidos de la expresión de BDNF en el hipocampo y en el giro dentado (Smith et al., 1995). La expresión de BDNF y del receptor TrkB aparece reducida en muestras *post-mortem* de sujetos con TDM (Tripp et al., 2012) y en los linfocitos de estos pacientes tras un período de retirada de la medicación (Pandey et al., 2010). Los niveles séricos de BDNF también disminuyen en estos pacientes (Karege et al., 2002; Kim et al., 2007) y se ha señalado que cierto polimorfismo en el gen BDNF puede ser predictivo de la cronicidad de la depresión (Lee et al., 2013). Por otra parte, se ha encontrado en modelos animales y humanos que ciertas terapias antidepresivas, como la terapia electroconvulsiva (TEC) y la estimulación magnética transcraneal repetitiva aumentan los niveles de BDNF (Gonul et al., 2005; Lanng et al., 2006).

La expresión del receptor de TrkB también se ha visto aumentada tras recibir tratamiento con TEC y fármacos antidepresivos (Nibuya et al., 1995).

El BDNF se forma mediante la escisión proteolítica de una proteína precursora denominada pro-BDNF que puede unirse al receptor de baja afinidad p75NTR y ejercer

un efecto contrario al de la señalización de BDNF / TrkB (Zagrebelsky et al., 2005; Woo et al., 2005).Acorde con esto se ha encontrado que la expresión de proBDNF y de p75NTR están regulados a la alza en el TDM (Zhou et al., 2013).

En conjunto, estos hallazgos ofrecen evidencia sobre la implicación causal de BDNF en la etiopatogenia del TDM. No obstante, hay que mencionar que estudios realizados con ratones heterocigotos que tienen silenciado el gen que codifica para BDNF no presentan comportamiento depresivo (MacQueen et al., 2001).

### **1.6. Las hormonas del estrés y la depresión mayor.**

El TDM va acompañado de una respuesta de mala adaptación al estrés debido a la disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) (Ströhle et al., 2010; Watson et al., 2006; Holsen et al., 2013). La alteración de la dinámica hormonal es bastante frecuente en el TDM y puede preceder a la aparición del mismo (Harlow et al., 2003), apoyando esto la participación del eje HPA en esta enfermedad (Young et al., 2002). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es liberada por el hipotálamo en respuesta a la percepción del estrés psicológico. Esta hormona induce la secreción de corticotropina por parte de la hipófisis que a su vez estimula a la glándula suprarrenal para liberar cortisol en el plasma. Entre las alteraciones hormonales más observadas en los pacientes con TDM se incluyen el deterioro de la inhibición de la liberación de cortisol por dexametasona (Rush et al., 1996; Sher et al., 2013; Ising et al., 2007), elevados niveles de cortisol y una respuesta exagerada de la secreción de cortisol frente a factores estresantes psicosociales (Villanueva, 2013).

Independientemente de si estas alteraciones son primarias o secundarias al TDM, es importante señalar que tanto los niveles elevados de estrés, como de las hormonas

glucocorticoides interfieren con la neurogénesis normal del hipocampo (Anacker et al., 2013) favoreciendo de así el desarrollo de esta enfermedad.

Hay bastantes pruebas que señalan que la hormona CRH desempeña un importante papel en la patogénesis de ciertos tipos de depresión. Niveles elevados de CRH han sido detectados en el líquido cefalorraquídeo de algunos sujetos deprimidos (Nemeroff et al., 1984). Estudios llevados a cabo con muestras de cerebro *post-mortem* de pacientes depresivos, han hallado un aumento del número de neuronas secretoras de CRH en regiones del sistema límbico (Raadsheer et al., 1994). Además, CRH ocasiona una serie de alteraciones fisiológicas y de comportamiento que se asemejan mucho a los síntomas de depresivos, entre los que se encuentran alteraciones del sueño, del apetito, alteraciones psicomotoras y disminución del deseo sexual (Nemeroff et al., 1996). También hay resultados preliminares que muestran que los antagonistas del receptor CRH1 reducen los síntomas depresivos (Holsboer et al., 2008).

### **1.7. Las hipótesis glutamatérgicas y GABAérgicas de la depresión.**

El ácido gamma-aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Una serie de estudios realizados con espectroscopia de resonancia magnética han mostrado una reducción del GABA en la corteza prefrontal y occipital en la depresión aguda (Hasler et al., 2007). Esto podría ser el reflejo del efecto del estrés agudo, ya que está demostrado que el estrés psicológico parece inducir una regulación pre-sináptica a la baja de la neurotransmisión GABAérgica pre-frontal (Hasler et al., 2010). Otros trabajos describen que el estrés crónico puede provocar una reducción de la función del receptor GABA-A, muy probablemente por la inducción de cambios en la síntesis de esteroides neuro-activos (Eser et al., 2006). Sin embargo, tanto los estudios que encuentran concentraciones normales de GABA en la corteza prefrontal de pacientes con episodios

depresivos en remisión (Hasler et al., 2005) como los que describen la falta de efectos de la drogas GABAérgicas sobre los síntomas depresivos (Birkenhager et al., 1995) suponen evidencias contradictorias para la hipótesis GABAérgica de la depresión.

Por su parte, el glutamato, el neurotransmisor excitatorio por excelencia del cerebro, también presenta niveles alterados en el TDM. Estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto que en el cerebro de los pacientes depresivos hay concentraciones elevadas de este neurotransmisor (Hasler et al., 2007). Los fármacos que actúan induciendo una inhibición de la liberación de glutamato, como el riluzol y la lamotrigina, han demostrado tener propiedades antidepresivas (Kendell et al., 2005). Otro fármaco, como la ketamina que actúa como antagonista de los receptores de glutamato N-glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) produce un fuerte y rápido efecto antidepresivo, incluso con una sola dosis, en pacientes depresivos que presentan resistencia al tratamiento (Zarate et al., 2006). Los estudios realizados con muestras *post-mortem* dan prueba de la existencia de una señalización anormal de NMDA en estos pacientes (Feyissa et al., 2009). En los últimos años, se está estudiando el papel del receptor de glutamato 5 metabotrópico en el TDM (Deschwanden et al., 2009).

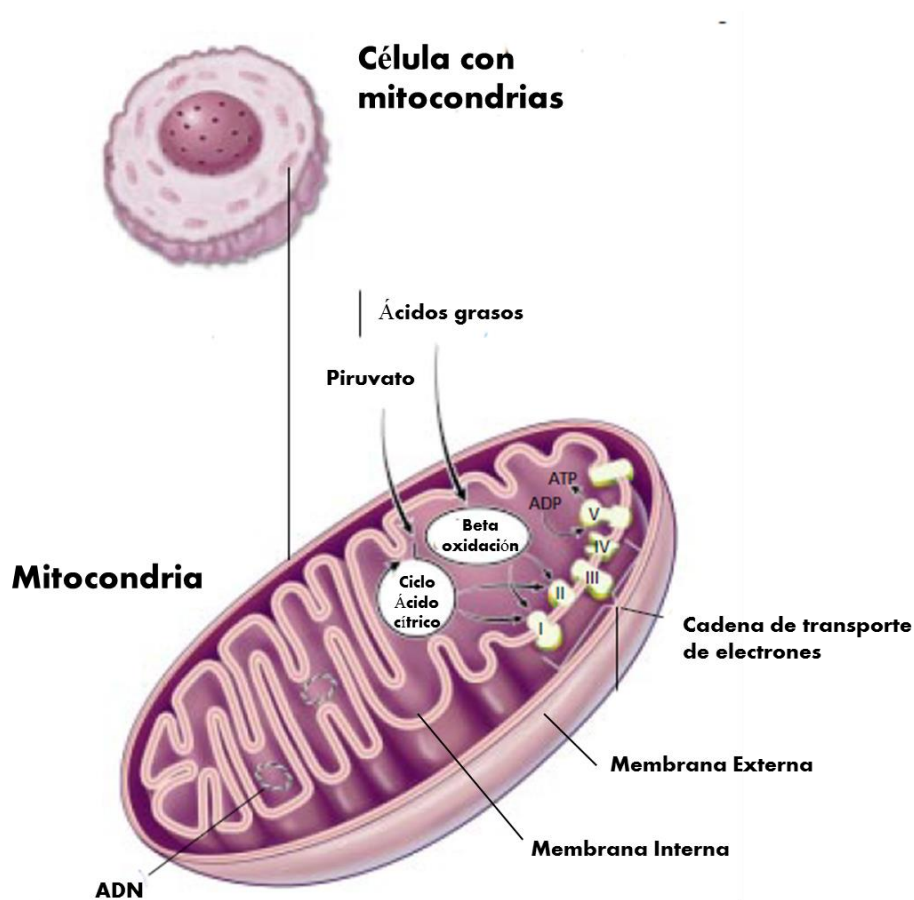
#### **1.8. Disfunción mitocondrial, estrés oxidativo/nitrosidativo e inflamación en la depresión.**

Dado que hasta la actualidad, las teorías formuladas sobre el origen de la depresión no dan una explicación exacta de las causas de la misma, en los últimos tiempos, han surgido nuevas líneas de investigación que subrayan el papel que la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo/nitrosidativo y la inflamación pueden desempeñar en la patogénesis de esta enfermedad.



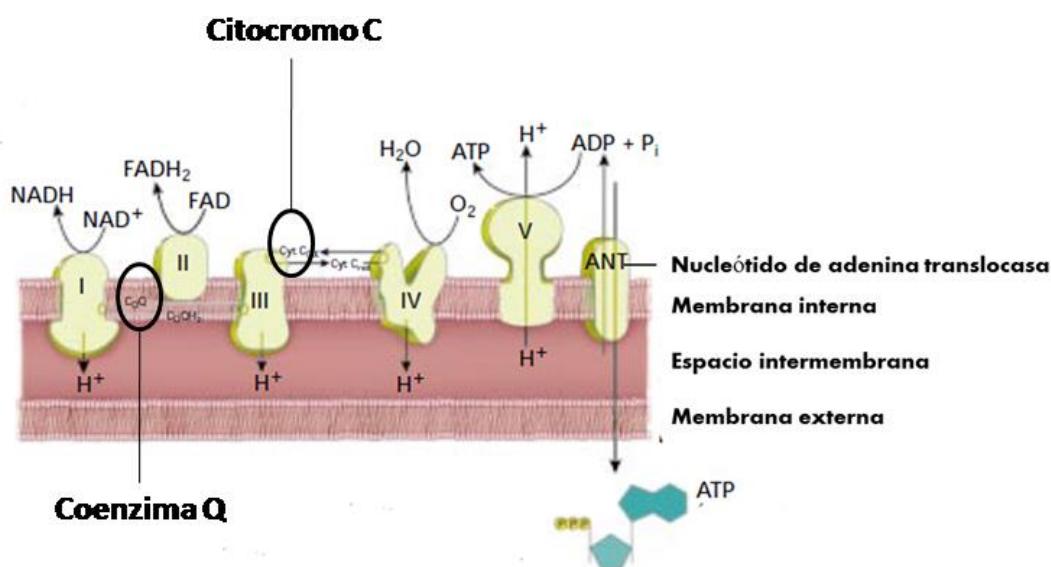
### 1.8.1. Sobre la mitocondria y la disfunción mitocondrial.

La mitocondria es un orgánulo dinámico que desempeña un papel central en numerosas funciones celulares, entre las que se encuentran la producción de energía (ATP), calor y el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular (**Figura 1**). Además, las mitocondrias son las responsables de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la activación de la muerte celular programada o apoptosis (Turrens, 2003).



**Figura 1.** Estructura de la mitocondria. La estructura de la mitocondria está constituida por una doble membrana, la molécula circular de ADN, situada en la matriz, así como la cadena respiratoria mitocondrial donde se desarrolla la fosforilación mitocondrial a partir de los sustratos derivados del metabolismo del piruvato y los ácidos grasos. Modificado de Cohen & Gold, 2001.

La principal función metabólica de la mitocondria es la fosforilación oxidativa, un proceso de generación de energía que acopla la oxidación de sustratos respiratorios con la síntesis de ATP (Pieczenik & Neustadt, 2007). La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta de cinco complejos multienzimáticos. El transporte de electrones entre los complejos I y IV está acoplado a la extrusión de protones a través de la membrana interna mitocondrial por los componentes de la bomba de protones de la cadena respiratoria. Este movimiento de protones crea un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. Los protones vuelven a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa que utiliza la energía obtenida de este modo para sintetizar ATP a partir de ADP (Adenosín difosfato) y de fosfato inorgánico. Tanto el ADN mitocondrial como el ADN nuclear codifican para los componentes polipeptídicos de estos complejos. Como consecuencia, las mutaciones en cualquiera de estos genomas pueden causar disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que deterioraría el transporte de electrones y/o protones y disminuiría la síntesis de ATP. Las enfermedades genéticas primarias o secundarias que afectan a la cadena respiratoria mitocondrial o las disfunciones mitocondriales secundarias, suelen afectar principalmente al cerebro y al músculo esquelético debido a sus elevadas necesidades energéticas. Además de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial, dos transportadores de electrones como la coenzima  $Q_{10}$  (CoQ<sub>10</sub>) y el citocromo C, son esenciales para la síntesis mitocondrial de ATP. La CoQ<sub>10</sub> se encarga de transportar los electrones de los complejos I y II al III y es esencial para la estabilidad del complejo III (**Figura 2**). La CoQ<sub>10</sub> también funciona como un antioxidante que protege a las células tanto por la eliminación directa de los ROS, como por la regeneración de otros antioxidantes como las vitaminas C y E (Turunen et al., 2004).



**Figura 2.** Cadena respiratoria mitocondrial. Los complejos multiprotéicos se sitúan en la membrana interna mitocondrial donde se realiza el transporte de electrones que generarán un gradiente de protones a lo largo de la membrana permitiendo la síntesis de ATP. El CoQ actúa como transportador de electrones, transfiriéndolos de los complejos I y II al complejo III, que a su vez los cede al citocromo c. El complejo IV cede los electrones del citocromo a C al O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al mismo tiempo se desarrolla un flujo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana que produce un gradiente electroquímico que permite la síntesis de ATP mediante la formación de un enlace de alta energía entre ADP y fosfato. Modificado de Cohen & Gold, 2001.

La CoQ<sub>10</sub> también funciona como un antioxidante que protege a las células tanto por la eliminación directa de los ROS, como por la regeneración de otros antioxidantes como las vitaminas C y E (Turunen et al., 2004).

***Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).***

Además de energía, la fosforilación oxidativa mitocondrial también genera ROS y RNS. Cuando existen deficiencias en la cadena respiratoria mitocondrial, el exceso de electrones de los complejos I y III, pueden pasar directamente a  $O_2$  para generar el anión superóxido ( $O_2^-$ ). El superóxido se transforma posteriormente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por las enzimas de desintoxicación manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) o cobre/zinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), y luego a agua por la catalasa, glutathionperoxidasa (GPX) o peroxidoxin III (III PRX). Sin embargo, cuando estas enzimas no pueden convertir los ROS como el radical superóxido a agua lo suficientemente rápido, el daño oxidativo se produce y se acumula en la mitocondria. Si el  $H_2O_2$  se encuentra con un metal de transición reducido, o se mezcla con  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  puede reducirse aún más a radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) que es el agente oxidante más potente entre los ROS. De forma adicional, el óxido nítrico (NO) se produce dentro de las mitocondrias por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) y se difunde libremente en la mitocondria desde el citosol. El NO reacciona a continuación con el  $O_2^-$  para producir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Estos dos radicales junto con otros, pueden ocasionar alteraciones severas a la mitocondria y otros componentes celulares (Turrens, 2003).

En condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS está bastante regulada. Sin embargo, si la cadena respiratoria está inhibida, o ciertos componentes claves de la misma como el  $CoQ_{10}$  son deficientes, los electrones acumulados en los transportadores de la cadena, aumentan considerablemente el número de electrones desapareados que son transferidos a  $O_2$  para generar  $O_2^-$ . Una producción excesiva de ROS mitocondrial puede exceder la defensa antioxidante celular y el daño acumulado puede, en última instancia, destruir la célula por necrosis o por apoptosis. Además, los ROS tienen un papel bien establecido en la inflamación. El aumento de los niveles de mediadores inflamatorios

tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las interleuquinas, se han asociado con la disfunción mitocondrial y el aumento de la generación de los ROS (Naik y Dixit, 2011).

El daño a la mitocondria es causado principalmente por los ROS generados por las propias mitocondrias. Dentro de la mitocondria, los componentes que son particularmente vulnerables a los radicales libres son los lípidos, las proteínas, las enzimas de la fosforilación oxidativa y el ADN mitocondrial (Tanaka et al, 1996).

### **1.8.2. Disfunción metabólica mitocondrial en el TDM.**

El hecho de que las mitocondrias jueguen un papel fundamental en muchos de los procesos biológicos que se han relacionado con la depresión, ha llevado a muchos autores a proponer que la disfunción mitocondrial podría contribuir a la fisiopatología de la depresión mayor (Manji et al., 2012; Gardner y Boles, 2011).

Entre las pruebas experimentales que dan apoyo a la existencia de una disfunción metabólica mitocondrial en el TDM, se encuentran las siguientes:

#### ***1.8.2.1. La presencia de alteraciones psiquiátricas en personas con deficiencias mitocondriales.***

La depresión no es infrecuente, incluso a veces, es la única manifestación clínica presentada por los pacientes con trastornos mitocondriales (DiMauro y Schon, 2008). En varias revisiones realizadas sobre la medicina mitocondrial, aparece la depresión entre las manifestaciones más frecuentes de los trastornos mitocondriales (Chinnery y Turnbull, 1997; Finsterer, 2004). Las características cognitivas que presentan los pacientes con trastornos mitocondriales son básicamente impedimentos de la función ejecutiva, las alteraciones de la atención, de la memoria, del procesamiento viso-espacial y la función

psicomotora (Bosbach et al, 2003; Turconi et al., 1999), características todas ellas compartidas con los pacientes que tienen el diagnóstico de trastorno depresivo (Lee et al., 2009; Snayder, 2013).

Dado que la prevalencia de las enfermedades mitocondriales es baja, aproximadamente 1 de cada 5000 (Anglin et al 2012a), los estudios que se han realizado para analizar la prevalencia de las enfermedades psiquiátricas y más concretamente de depresión, en personas con desórdenes mitocondriales, presentan el inconveniente de contar con un reducido tamaño de la muestra. A pesar de esta limitación, existen pruebas experimentales de que las personas con trastornos mitocondriales conocidos presentan tasas más elevadas de trastornos psiquiátricos que la población general.

El estudio más extenso realizado hasta la fecha, llevado a cabo en 36 sujetos con diversas enfermedades mitocondriales (Fattal et al., 2007) demostró una tasa de prevalencia vital del 70% de determinadas enfermedades psiquiátricas. Entre estas enfermedades se encontraba la depresión mayor en el 54% de los casos, el trastorno bipolar en el 17% de los casos, y el trastorno de pánico en el 11%. Estas tasas de prevalencia fueron significativamente mayores que las encontradas en la población general y similar a las de sujetos con epilepsia y cáncer. Los pacientes con comorbilidad psiquiátrica eran en promedio mayores, tenían más condiciones médicas asociadas, mayor número de ingresos hospitalarios, y menor calidad de vida que los pacientes con enfermedades mitocondriales que no presentaban comorbilidad psiquiátrica. Otro dato destacado fue que los síntomas psiquiátricos precedieron al diagnóstico de trastorno mitocondrial en un promedio de 7,5 años. Los autores han sugerido que el etiquetado de ciertos pacientes psiquiátricos como "psicosomáticos" puede haber retrasado la búsqueda de otras etiologías, ya que esta etiqueta puede haber llevado a los clínicos a ignorar signos y síntomas físicos que con el tiempo se encontró que eran parte de su enfermedad

mitocondrial, creyendo que eran simplemente reflejos de la presentación psiquiátrica. Por este motivo, estos mismos autores llegaron a la conclusión de que los psiquiatras deberían considerar la posibilidad de una enfermedad mitocondrial en aquellos pacientes que cursan con múltiples signos y síntomas físicos que encajan en el espectro de los trastornos mitocondriales (Fattal et al., 2007).

En otro estudio realizado con niños y adolescentes (Koene et al., 2009), la depresión mayor se encontró en 5 de 35 niños (14%) diagnosticados de diversos trastornos mitocondriales con mutaciones genéticas identificadas. Lo que llevó a estos autores a concluir que el metabolismo energético anormal del sistema nervioso central podría ser un factor determinante en el desarrollo de la depresión en los pacientes con enfermedades mitocondriales. Esta tasa encontrada por Koene y sus colaboradores es mayor que la tasa de depresión pediátrica en la población general que varía entre el 3 y el 4% en niños y adolescentes (Merikangas et al., 2010).

En una revisión de la literatura sobre las manifestaciones psiquiátricas encontradas en los trastornos mitocondriales (Anglin et al., 2012), los autores encontraron que de los 50 casos clínicos revisados, el trastorno depresivo mayor fue el diagnóstico más prevalente, habiéndose encontrado en 22 de los 50 informes, o lo que es lo mismo, en el 44% de los casos.

Smits y colaboradores (2011), hicieron un estudio con 28 sujetos que estaban diagnosticados de oftalmoplejía externa progresiva dominante (CPEO), uno de los trastornos mitocondriales más comunes en adultos, y descubrieron que la depresión estaba presente en aproximadamente un tercio de los mismos. Además la frecuencia de depresión era mayor (32,1 frente a 7,1%) que la encontrada en sujetos que padecían distrofia miotónica tipo 1(DM1) que es una enfermedad crónica e incapacitante pero no

mitocondrial. En otros estudios realizados en CPEO, los autores encontraron que los síntomas depresivos aparecieron varios años antes del diagnóstico de la enfermedad mitocondrial (Suomalainen et al., 1992).

Mutaciones en C10ORF2 y POLG1, dos genes nucleares que regulan la función mitocondrial, también han sido implicadas en los trastornos del estado de ánimo (Van Goethemet al., 2003; Mancuso et al., 2004).

Otra enfermedad mitocondrial en la que aparecen muy frecuentemente síntomas psiquiátricos es en MELAS (Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y accidente), en la que se presenta la mutación m.3243 A>G en el gen mitocondrial MTTL1 (Kaufmann et al., 2009). Los pacientes con síndrome de MELAS tienen una alta prevalencia de alucinaciones visuales o auditivas, delirios de persecución, comportamientos erráticos y depresión. Además, el comportamiento depresivo no parece limitarse a los pacientes diagnosticados, sino que casi un tercio de sus familiares portadores asintomáticos tienen depresión.

Para resumir, podríamos decir que los trastornos depresivos son comunes en individuos con trastornos mitocondriales y se observan tanto en adultos como en niños. La aparición de los síntomas de depresión a menudo precede al diagnóstico del trastorno mitocondrial. Este hecho podría sugerir que el trastorno depresivo podría ir ligado al trastorno mitocondrial cerebral en lugar de a la tensión que pudiese surgir como consecuencia del diagnóstico de enfermedad mitocondrial o a la gravedad de los síntomas que la acompañan. No obstante, hacen falta más estudios que aclaren hechos como el por qué no se ha encontrado la mutación m.3243 A>G en el gen mitocondrial MTTL1 que tanta relación tiene con los síntomas psiquiátricos en los pacientes diagnosticados de depresión mayor (Munakata et al., 2005).



### ***1.8.2.2. Anormalidades bioenergéticas detectadas por neuroimagen en el trastorno depresivo.***

Los estudios con espectrometría de resonancia magnética (MRS) y tomografía por emisión de positrones (PET), han proporcionado pruebas experimentales de una participación de la bioenergética en la fisiopatología y respuesta al tratamiento antidepresivo del TDM. Los primeros trabajos en esta área, fueron realizados utilizando un tipo de RMN, concretamente la espectrometría de resonancia magnética con fósforo 31 (MRS (P31)) para medir las concentraciones de compuestos fosfatos de alta energía en el tejido cerebral y explorar anormalidades de base en el metabolismo energético cerebral. En este sentido, en un estudio llevado a cabo por Moore y colaboradores (1997) con 35 sujetos deprimidos no medicados en comparación a 18 sujetos control, se encontró una significativa reducción del 16% en trifosfato beta-nucleósido (NTP), compuesto que surge principalmente a partir de ATP. Volz y colaboradores han descrito un aumento del fosfomonoéster (PME), de la presencia de adenosina monofosfato (AMP), y de la disminución de los valores de ATP en los lóbulos frontales de 14 pacientes, en su mayoría medicados, con depresión mayor en comparación con 8 controles de la misma edad (Volz et al. 1998). Hay que señalar que en este estudio los porcentajes de PME correlacionaron de forma negativa con la gravedad de la depresión, con lo que no podría considerarse como un biomarcador de esta enfermedad.

Estudios con PET utilizando (18F) fluorodesoxi-glucosa (FDG) han puesto de manifiesto que existe un descenso metabólico tanto en el trastorno depresivo mayor como en el trastorno bipolar (Al- Mousawi et al., 1996). En la depresión mayor, se han hallado tasas metabólicas reducidas en la corteza prefrontal, en la corteza cingulada anterior y en el núcleo caudado (Videbech, 2000). Además, los sujetos con trastorno bipolar que se encuentran en la fase depresiva del trastorno muestran un metabolismo reducido de todo

el cerebro en comparación con los que encuentran en fase maníaca (Strakowski et al., 2000). En otro trabajo en el que se evaluaron estudios de imágenes de tomografía por emisión de positrones, de tomografía computarizada por emisión de fotón único, y de resonancia magnética, para determinar correlatos anatómicos y metabólicos con los trastornos del estado de ánimo, se encontraron cambios de volumen y cambios en la estructura en la corteza medial prefrontal, la corteza orbital medial y caudolateral, la amígdala, el hipocampo, la parte ventromedial de los ganglios basales, y la corteza cingulada anterior (Rigucci et al., 2010).

En un estudio con resonancia magnética en el que se evaluó el volumen de la corteza frontal orbital en 15 pacientes con trastorno depresivo mayor en remisión en comparación con 20 controles sanos, se encontró que los primeros tenían un volumen un 32% menor de la corteza orbito-frontal medial que los controles, sugiriendo esto que el TDM puede causar cambios crónicos en el tejido cerebral (Bremner et al., 2002).

Forester y colaboradores realizaron un análisis en el tejido cerebral de las concentraciones de compuestos fosfatos de alta energía beta y de los niveles de NTP totales, mediante MRS (P31), en 13 adultos mayores con depresión en comparación con 10 controles sanos y detectaron reducciones significativas del 8% de beta-NTP y del 6% de NTP en el total del tejido cerebral en sujetos con depresión geriátrica en comparación con los controles sanos (Forester et al. 2009). Lo más curioso fue que también encontraron una reducción significativa del 2% en los niveles de NTP total después de 12 semanas de tratamiento con el antidepresivo sertralina (ISRS), lo que indica una disminución de los metabolitos fosfatos de alta energía con el tratamiento.

Finalmente, Renshaw y colaboradores utilizaron tanto MRS (1H) como MRS (P31) para estudiar las diferencias iniciales, así como los cambios ocurridos después de un

tratamiento con fluoxetina (antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina, ISRS), en los niveles cerebrales de purinas (que se derivan principalmente de los fosfatos de adenosina) y en el nivel en tejido cerebral de beta-NTP (indicativo de los niveles de ATP) (Renshaw et al., 2001). Estos autores encontraron que no hubo diferencias significativas entre los niveles de base de purina y de beta-NTP de los 38 sujetos con TDM y de los 22 sujetos de control. Sin embargo, sí encontraron relaciones entre la línea base de purina y los niveles de beta-NTP y la respuesta al tratamiento, esto es, los niveles de purina y de beta-NTP disminuyeron en un 30% y en un 21%, respectivamente, en los sujetos que fueron medicados con fluoxetina.

En resumen, aunque la literatura sobre la bioenergética cerebral en depresión utilizando MRS no es muy abundante, puede sugerir, aunque sea de manera inconsistente, que la bioenergética del cerebro está comprometida en algunos pacientes con depresión mayor y puede cambiar en respuesta al tratamiento antidepresivo.

#### ***1.8.2.3. Pruebas genéticas del deterioro mitocondrial en el TDM.***

Los estudios de asociación genética proporcionan datos a favor de la existencia de anomalías mitocondriales en personas que sufren TDM. Esto es apoyado por las pruebas experimentales que sugieren: 1) Una herencia materna de la depresión a través de alteraciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) (Bergemann et al., 2010; Boles et al. 2005; Burnett et al. 2005); 2) Una disminución de la expresión génica de genes mitocondriales en los pacientes con TDM (Shao et al., 2008); 3) Las variaciones en el número de copias, heteroplasmia, o deleciones del ADNmt (Kim et al., 2011; Gardner et al., 2003; Torrell et al., 2013); y 4) Un aumento de la expresión génica de genes mitocondriales después del ejercicio asociado a una reducción del comportamiento depresivo en modelos animales (Aguar et al., 2014).

Muchos casos de depresión que parecen ser heredados por vía materna, apoyan la hipótesis de que algunos de los factores genéticos en la depresión se heredan en el ADNmt. Por ejemplo, estudios realizados con las madres de sujetos con trastornos mitocondriales de herencia materna conocida demostraron que éstas tenían de tres a cuatro veces mayor frecuencia de diagnóstico de depresión que aquellas madres de sujetos con trastornos mitocondriales que no eran de herencia materna o con otros trastornos genéticos (Burnett et al., 2005; Boles et al., 2005).

El genoma mitocondrial completo juega un papel importante en la función mitocondrial, por lo que cualquier anormalidad que se presente en el mismo podría resultar en una alteración de la función mitocondrial. Sin embargo, encontrar perturbaciones específicas en el ADNmt que influyan directamente en el desarrollo de un TDM ha sido difícil. Varios estudios han examinado la asociación entre la depresión y polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), variaciones del número de copias y deleciones en el ADNmt. Hasta el momento, no se han identificado SNPs en el ADNmt que se hayan asociado de forma significativa con la depresión (Munakata et al., 2005, 2007; Rollins et al., 2009; Gardner et al., 2003). En lo que se refiere al número de copias de ADNmt hay controversia, ya que hay estudios que han encontrado un bajo número de copias (Kim et al., 2011) en sujetos deprimidos, mientras que otros no han encontrado diferencias (He et al., 2014). Las pruebas experimentales para las deleciones son también controvertidas. Así, Gardner y su grupo encontraron una delección del ADNmt significativa asociada con la depresión (Gardner et al., 2003), mientras que los exámenes de la delección común de 4.977 pb en el ADNmt no han revelado ninguna asociación con la depresión (Sabunciyan et al., 2007a).

Por otro lado, las variaciones en los genes nucleares pueden también interferir en el funcionamiento normal de la mitocondrias y de esa forma, contribuir al desarrollo de la

depresión. Aunque se han realizado pocas investigaciones al respecto, merece la pena destacar algún estudio como el realizado por el grupo de McFarquhar, en el que se examinó una muestra comunitaria de 1220 individuos de 18-60 años de edad, 649 de los cuales tenían una historia de depresión sin antecedentes de episodios maníacos y se demostró que el alelo G del gen TOMM40, que codifica una proteína esencial para la importación de precursores de proteínas en la mitocondria, estaba asociado con un mayor riesgo para desarrollar depresión a lo largo de la vida. Además, aquellos individuos con el alelo G eran menos extrovertidos y tenían alterado el procesamiento neural de caras tristes como se mostraba en el fMRI (McFarquhar et al., 2014).

#### ***1.8.2.4. Evidencias encontradas en estudios histológicos humanos (post-mortem) sobre la implicación de las alteraciones metabólicas en el TDM.***

El estudio del tejido cerebral humano obtenido *post-mortem* es otro enfoque utilizado para la investigación de la estructura y la función mitocondrial en personas con trastorno depresivo mayor. Dado que los trastornos mitocondriales con mutaciones en el ADNmt se caracterizan muy frecuentemente por presentar heteroplasmia, en la que la cantidad de mitocondrias con una determinada mutación genética puede variar significativamente en los diferentes órganos del cuerpo, se hace necesario analizar el tejido cerebral real en lugar de los tejidos periféricos tales como el músculo o los leucocitos cuando se intenta dilucidar una etiología mitocondrial del trastorno depresivo.

Con respecto a la búsqueda de alteraciones mitocondriales en el ADNmt, los investigadores no han observado la presencia de deleciones comunes en muestras post-mortem de cerebro de sujetos con depresión unipolar (Sabunciyan et al 2007b; Shao et al., 2008). Munakata y colaboradores no detectaron la mutación puntual m.3243A> G, relacionada con el trastorno mitocondrial MELAS en 15 cerebros de personas

diagnosticadas de depresión mayor, en cambio ésta sí apareció en 2 de 15 cerebros con trastorno bipolar y en 1 de 15 cerebros de sujetos con esquizofrenia (Munakata et al., 2005). En otro estudio, Rollins et al. (2009) tampoco hallaron diferencias significativas en las variaciones de la secuencia de ADN mitocondrial y los niveles de heteroplasmia en la corteza prefrontal y dorsolateral de 15 cerebros pertenecientes a pacientes con TDM en comparación con 36 cerebros de control. Después de ajustar por sexo, edad, el pH y la tensión agónica, Shao et al. (2008) observaron una disminución significativa de la expresión de 6 de los 13 transcritos que codifican en el ADNmt en tejido *post-mortem* de la corteza frontal de 15 cerebros pertenecientes a sujetos con TDM en comparación con 37 controles no psiquiátricos.

En un análisis proteómico del cerebro de 15 pacientes depresivos unipolares frente a 15 controles sanos, se ha encontrado alterada la expresión de 4 proteínas mitocondriales de la corteza cingulada anterior (Beasley et al. 2006).

En resumen, aunque existe poca evidencia *post-mortem* de mutaciones del ADNmt o del ADNn en las personas con TDM, hay ciertas pruebas que sugieren aunque de forma inconsistente, una expresión de genes y unos niveles de proteínas mitocondriales alterados, así como una alterada bioenergética del cerebro en estos pacientes.

#### ***1.8.2.5. Modelos animales para detectar anomalías mitocondriales en la depresión.***

Ya que el estrés es un factor de riesgo conocido para el TDM, la mayoría de los estudios realizados para conocer las posibles anomalías mitocondriales en esta enfermedad, utilizan un modelo de estrés crónico leve o impredecible en roedores para modelar comportamientos depresivos en estos animales. Los animales estresados muestran anhedonia (pérdida de la capacidad para buscar o experimentar placer) que por lo general se ve expresada por una reducción en el consumo de alimentos, por la no preferencia por

bebidas endulzadas, la pérdida o la no ganancia de peso, a veces incluso por otros índices como los niveles hormonales adrenales o el peso de la glándula adrenal. Además, el estrés crónico produce en pruebas como la de natación forzada y la de suspensión por la cola, menos nado o lucha y un mayor tiempo de inmovilidad, respectivamente, indicios que se consideran comportamientos parecidos a la depresión (Krishnan y Nestler, 2011). Así, Rezin et al. (2008), tras someter a ratas a 40 días de estrés crónico leve, encontraron que éstas mostraban comportamientos parecidos a los depresivos que se vieron reflejados en una disminución del consumo de comida azucarada, una no ganancia de peso corporal y un aumento del peso de la glándula adrenal. Los hallazgos en la bioenergética mitocondrial fueron una disminución de la actividad de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en la corteza cerebral y en el cerebelo pero no en el hipocampo, en el córtex prefrontal y en el estriado. La actividad de la creatina quinasa no se vio alterada. Un año más tarde, realizaron el mismo estudio pero administrando el antidepresivo ketamina y observaron que ésta revirtió la inhibición de los complejos I, III, y IV (Rezin et al., 2009). Así mismo, Liu y Zhou (2012) descubrieron en el mismo modelo, que el tratamiento con corticosterona durante la inducción de estrés, disminuyó la ratio de glutatión reducido/oxidado, el potencial de membrana, la actividad de las enzimas de los complejos I y IV, la expresión de mitofusina y produjo un aumento de la producción de ROS. Además, en ratas Flinders (modelo genético de depresión), se observó un número reducido y un incremento del volumen de las mitocondrias en la región CA1 hipocampal. Es interesante resaltar que el tratamiento durante 14 días con el antidepresivo imipramina incrementó el número de mitocondrias en CA1 (Chen et al., 2013). Por último, ratones estresados durante 6 semanas, desarrollaron comportamientos relacionados con la depresión, al mismo tiempo que se encontró una disminución de la

respiración mitocondrial, del potencial de membrana, y daños estructurales en el hipocampo, córtex e hipotálamo (Gong et al., 2011).

Para concluir, podríamos decir que los estudios realizados con modelos animales de depresión aportan evidencias sobre alteraciones en la estructura y el funcionamiento de las mitocondrias en ciertas áreas del cerebro que están implicadas en los circuitos neuronales de la depresión en los humanos, como la corteza prefrontal y el hipocampo (Carlson et al. 2006). Además, los tratamientos antidepresivos parecen mitigar algunos de estos déficits.

### **1.8.3. Estrés oxidativo y nitrosidativo en el trastorno depresivo mayor.**

En los últimos años ha surgido la hipótesis que recalca la importancia de las vías inflamatorias y de estrés oxidativo y nitrosidativo en la fisiopatología de la depresión (Maes, 2008). Tanto la inflamación como los procesos metabólicos mitocondriales se caracterizan por la generación de radicales libres que son moléculas altamente reactivas. Algunos ejemplos de ROS y de RNS son el anión superóxido, el óxido nítrico, el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones fisiológicas normales estos radicales libres están fuertemente regulados por sistemas de defensa consistentes en antioxidantes (p.e. CoQ10, vitaminas C y E, y glutatión), enzimas (p.e. SOD, GPX y catalasa) y proteínas (p.e. albúmina, transferrina, haptoglobina y ceruloplasmina) con función antioxidante. Pero cuando se producen en exceso, o cuando se ven comprometidos los sistemas antioxidantes, los radicales libres se acumulan y pueden causar daños a los ácidos grasos y las proteínas de las membranas de las células y con al ADN (Maes et al., 2009a, b, c). Estos procesos desembocan en disfunciones celulares a través de daños en la membrana celular, las mitocondrias, las proteínas funcionales y el ADN que pueden resultar en apoptosis y muerte celular. Como los radicales libres son



generados principalmente dentro de la mitocondria, el estrés oxidativo tiene la capacidad de dañar las defensas mitocondriales, perpetuando todavía más el OS y NS. Determinados órganos del cuerpo, como es el caso del cerebro, son más vulnerables a los efectos adversos del OS y NS debido a la alta tasa metabólica y los bajos niveles de antioxidantes que posee.

Los estudios realizados para analizar el papel del estrés oxidativo en la depresión ponen de manifiesto que la depresión presenta un perfil de O y NS que se caracteriza por:

- a) Bajos niveles de antioxidantes y de enzimas con propiedades antioxidantes.
- b) Un aumento de ROS y RNS.
- c) Un aumento de O & NS.
- d) Un aumento de las alteraciones en los ácidos grasos de las membranas, en las proteínas funcionales y en el ADN.
- e) Respuestas autoinmunes contra neoepítopos formados por los daños a los ácidos grasos de las membranas y a las proteínas.
- f) Una asociación significativa entre la depresión y polimorfismos en los genes que codifican para proteínas de OS y NS.

A continuación se detallan las pruebas experimentales encontradas para cada uno de estos aspectos:

#### ***1.8.3.1. Los antioxidantes y las enzimas antioxidantes en el TDM.***

En un estudio de revisión realizado por Maes y su equipo (Maes et al. , 2000) se concluye que la depresión se caracteriza por un estado antioxidante disminuido de forma significativa reflejado por bajos niveles de zinc, albúmina, tirosina, triptófano, y vitamina E, todos ellos compuestos con propiedades antioxidantes.

El glutatión es otro antioxidante que se ha examinado en los pacientes deprimidos. Ya en 1934, se constató una reducción en la concentración sanguínea del glutatión reducido (GSH), la forma activa del glutatión, en los principales trastornos psiquiátricos (Looney y Childs, 1934). Más recientemente, Kodydkova et al., (2009) encontraron concentraciones sanguíneas de GSH disminuidas en mujeres deprimidas. Los niveles de CoQ<sub>10</sub> también han sido analizados en los pacientes con TDM, hallándose concentraciones en suero significativamente más bajas de CoQ<sub>10</sub> en comparación con los controles sanos (Maes et al., 2009). De forma similar, los niveles de ácido ascórbico en plasma en personas con TDM están disminuidos en comparación con los controles (Khanzode et al., 2003).

Los niveles reducidos de estas moléculas, podrían estar contribuyendo a la bajada de la capacidad antioxidante total (TAC) en sangre que ha sido descrita en la depresión (Cumurcu et al., 2009). Además, este autor constató una correlación inversa entre la TAC y la gravedad de los síntomas depresivos utilizando la Escala de Depresión de Montgomery-Asberg. Galecki y su equipo observaron que los bajos niveles de TAC no se normalizaban después del tratamiento con antidepresivos ni cuando el paciente se encontraba en estado de remisión, lo que señalaría a la baja TAC como un posible marcador para la depresión, aunque más estudios son necesarios al respecto. La GPX es una importante enzima antioxidante que actúa eliminando los radicales libres acumulados (Herbette et al., 2007). En este sentido, Ozcan et al. (2004) y Maes et al., (2010b) concluyeron que la actividad de la GPX era significativamente menor en los pacientes con trastornos afectivos y además, encontraron correlaciones negativas significativas entre la actividad general de la GPX en sangre y la gravedad de la depresión. Sin embargo, son necesarios más estudios, ya que otros autores no encuentran esta baja actividad de la GPX en humanos (Galecki et al., 2009a; Andreazza et al., 2009). Los

estudios animales realizados al respecto con ratas bulbectomizadas y/o con ratas Wistar con depresión inducida por estrés leve crónico, sí han corroborado la existencia de una menor actividad de GPX (Song et al., 1994; Eren et al, 2007a, b).

La catalasa es una enzima que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y media en la señalización de la apoptosis, el metabolismo de los azúcares, la proliferación celular y la activación de las plaquetas (Chelikani et al., 2004; Góth et al., 2004). Varios estudios han examinado la actividad de la catalasa en pacientes deprimidos, encontrando niveles incrementados de actividad de esta enzima durante los episodios agudos de depresión. Szuster-Ciesielska et al., (2008) también han detectado un aumento de la actividad de la catalasa en suero de pacientes deprimidos. El aumento de la actividad de esta enzima puede obedecer a un mecanismo compensatorio para atenuar las vías de OS y NS inducidas, y es congruente con un papel de señalización de los radicales libres oxidativos (Maes et.al., 2011).

Con respecto a las enzimas superóxido dismutasas (SODs), los trabajos realizados con pacientes deprimidos arrojan resultados inconsistentes. Algunos estudios hablan de bajos niveles de actividad de la SOD en pacientes deprimidos (Galecki et al., 2007; Selek et al., 2008; Herken et al., 2007), mientras que otros encuentran aumentada la actividad de esta enzima (Sarandol et al., 2007; Andreazza et al., 2007; Michel et al., 2007). Como ocurre con la catalasa, el aumento de la actividad de la SOD probablemente esté reflejando un mecanismo de compensación para luchar contra la acumulación de ROS y de radicales libres en la depresión (Maes et al., 2011). Un factor a tener en cuenta que podría explicar las diferencias en los resultados de estos estudios sería el estado o duración de la enfermedad (Berk et al., 2007a,b; Maes et al., 2010a). Podría existir una respuesta bifásica en la producción de ROS, con una elevación considerable de sus niveles en la fase aguda de la enfermedad que iría seguida de una normalización de los niveles en la fase crónica,

que estaría detrás de las diferencias encontradas en los diferentes estudios (Maes et al., 2010a).

#### ***1.8.3.2. Los radicales libres en la depresión mayor.***

En la actualidad existen bastantes estudios que muestran un aumento de radicales libres en la depresión. La mayoría de estos estudios se han centrado en analizar los niveles de: peróxido, NO, la enzima sintetasa inducible de NO (iNOS) y la enzima pro-oxidante xantina oxidasa (XO).

El peróxido es uno de los ROS circulantes en la sangre. Maes et al. (2010a) publicaron que los pacientes con TDM presentaban mayores niveles de peróxido en plasma, sin embargo, estos niveles no correlacionaban de forma significativa con la severidad de los síntomas depresivos. Un dato importante de este estudio es que estos autores encontraron que este aumento de los niveles de peróxido sólo se apreciaba en pacientes que se encontraban en la fase aguda de la enfermedad y no en la fase crónica (más de dos años de duración) (Maes et al., 2010a). Estos resultados señalan que puede producirse una normalización de los niveles de ROS cuando la enfermedad se vuelve crónica.

El NO es un segundo mensajero intracelular que se sintetiza a partir de L-arginina por la NOS, una familia de enzimas, que posee una forma constitutiva (cNOS) y una forma inducible (iNOS), siendo esta última la que genera los efectos inflamatorios del NO. El NO interviene en funciones como la vasodilatación, la neurotransmisión, la inmunomodulación, o la defensa inespecífica contra microorganismos (Maes et al., 2011). Se cree que la vía L-arginina-NO juega un importante papel en la fisiopatología del TDM y en los mecanismos de acción de los antidepresivos (Pinto et al., 2008). Sin embargo, las mediciones realizadas en las pacientes afectados de TDM arrojan resultados poco consistentes, habiendo autores que han encontrado niveles plasmáticos altos de NO

en pacientes con depresión mayor (Seleket al., 2008; Weiet al., 2009), mientras que otros han encontrado niveles bajos de NO (Ikenouchi-Sugita et al., 2009; Ozcan et al., 2004) en pacientes con TDM. En un estudio realizado con muestras *post-mortem*, se halló que tanto los pacientes con depresión como los pacientes con trastorno bipolar tenían un mayor número de neuronas que expresaban NOS en las regiones CA1 y en el subículo de la formación hipocámpal que los sujetos controles sanos (Oliveira et al., 2008). Así mismo, Wang et al., (2008), en un trabajo con roedores, encontraron que la supresión de iNOS en el hipocampo impide el desarrollo de la depresión inducida por el estrés leve inesperado crónico. Otro estudio destaca el efecto antidepresivo de los inhibidores de nNOS y iNOS (Volke et al., 2003; Gigliucci et al., 2010). Todos estos resultados apoyan la participación del NO en la fisiopatología de la depresión mayor, no obstante son necesarios más estudios que aclaren el porqué de las contradicciones encontradas.

XO es una enzima que cataliza la oxidación de la xantina, un proceso que genera ROS, superóxido, peróxido de hidrógeno, y RNS (Harrison, 2004). Hay estudios que encuentran concentraciones elevadas de XO en suero (Herken et al., 2007) y aumento de la actividad de esta enzima en regiones córtico-límbico-talámico-estriatales en muestras *post-mortem* de sujetos depresivos (Michel et al., 2008).

#### ***1.8.3.3. Daños por OS& NS en la depresión mayor.***

El aumento de ROS/RNS y la disminución de las defensas antioxidantes halladas en los pacientes diagnosticados de TDM, pueden producir modificaciones oxidativas y nitrosidativas de las moléculas celulares como los ácidos grasos, las proteínas y el ADN que pueden conllevar efectos adversos sobre las membranas lipídicas, la función y estabilidad de las proteínas y daños al ADN y a sus mecanismos de reparación. Estas

alteraciones patológicas pueden resultar en apoptosis, y contribuyen en cierta forma a explicar los cambios cerebrales volumétricos hallados en la depresión (Maes et al., 2011).

#### **1.8.3.3.1. El daño oxidativo a lípidos y ácidos grasos en la depresión.**

Los primeros informes que muestran que la depresión puede ir acompañada por un aumento del daño oxidativo a los ácidos grasos vienen de estudios que encuentran bajos niveles del ácido graso omega-3 en esta enfermedad (Edwards et al., 1998; Maes et al., 1999).

Una herramienta que se suele utilizar para medir el grado de peroxidación lipídica, y por lo tanto de estrés oxidativo, es la determinación de malondialdehído (MDA), un subproducto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y del ácido araquidónico. Se han encontrado niveles elevados de MDA en suero (Khanzode et al., 2003; Ozcan et al., 2004), en sangre periférica (Galecki et al., 2009a) y en plasma (Sarandol et al., 2007) de pacientes con TDM. Se ha encontrado además que el tratamiento con el antidepresivo fluoxetina reduce los niveles de MDA (Galecki et al., 2009a). El ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), otro test utilizado para estimar el grado de peroxidación lipídica, ha mostrado que los sujetos con TDM poseen concentraciones más elevadas de TBARS que los sujetos sanos (Galecki et al., 2007).

#### **1.8.3.3.2. El daño al ADN en la depresión.**

En condiciones fisiológicas normales, los ROS y RNS atacan al ADN causando la oxidación de nucleósidos. Este hecho junto con que las vías de reparación del ADN también son sensibles al OS & NS (Jaiswal et al., 2001; Feng et al., 2006) aumenta el potencial mutagénico y el daño al ADN. Una de estas lesiones es la hidroxilación de la guanina a 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-OHdG) que una vez eliminada del ADN, se

puede encontrar en el plasma y ser excretada en la orina (Wu et al., 2004; Bohr et al., 2002). Por este motivo, el ensayo de 8-OHdG en la orina es un biomarcador de daño oxidativo del ADN en particular y un biomarcador de OS y NS en general (Wu et al., 2004; Valavanidis et al., 2009). En este sentido, existen algunos hallazgos de que la depresión mayor va acompañada de un aumento de 8-OHdG en orina, indicando así el daño oxidativo del ADN (Wei et al., 2009; Maes et al., 2009b).

Otro aspecto estudiado en relación al daño producido en el ADN por parte de ROS, es el papel de ciertos antioxidantes como la CoQ<sub>10</sub>. Como se ha comentado anteriormente, la CoQ<sub>10</sub> ofrece protección contra los efectos perjudiciales de los ROS que se liberan durante el proceso oxidativo en las mitocondrias (Chaturvedi y Beal, 2008; Liu, 2008). Por consiguiente, el síndrome de bajada de CoQ<sub>10</sub> presente en la depresión predispone a disfunciones mitocondriales, incluyendo el daño oxidativo y nitrosidativo al ADNmt. Alteraciones de la expresión génica y deleciones del ADN mitocondrial se han hallado con frecuencia en el TDM (Shao et al., 2008; Gardner et al., 2003; Suomalainen et al., 1992).

#### **1.8.3.3.3. Daños nitrosativos a las proteínas en la depresión.**

Durante los procesos inflamatorios, la producción de NO puede provocar toxicidad tisular después de reaccionar con aniones superóxido, generando así aniones peroxinitrito y el ácido peroxinitro que pueden nitrar compuestos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina, resultando en la formación de NO-tirosina (Lin et al., 2000). Esta nitración de la tirosina se suele usar como una huella para la producción in vivo de ROS y RNS. Niveles aumentados de NO-tirosina han sido observados en pacientes con trastorno bipolar (Andreazza et al., 2009).

***1.8.3.4. Respuestas autoinmunes contra neoepítomos formados por daños a los ácidos grasos de las membranas y a las proteínas.***

**1.8.3.4.1. El aumento de anticuerpos contra LDL oxidado.**

Los autoanticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) formados contra lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas por oxidación, son un reflejo del OS y NS y la peroxidación lipídica que tiene lugar in vivo. Durante la oxidación de LDL, se forman neoepítomos fuertemente inmunogénicos que pueden provocar respuestas autoinmunes mediadas por IgG y por IgM que pueden ser detectadas en sangre (Mandal et al., 2005). La inmunoglobulina (IgG) contra LDL oxidada (oxLDL), ha sido encontrada aumentada significativamente en suero de sujetos con depresión (Maes et al., 2010a). Este hecho sugiere que la depresión está acompañada por un aumento de la peroxidación lipídica y por un aumento de las respuestas autoinmunes contra lípidos dañados (Maes et al., 2010a).

**1.8.3.4.2. El aumento de las respuestas de IgM a los de ácidos grasos de la membrana en el TDM.**

La peroxidación de los ácidos grasos de las membranas puede ir acompañada de la generación de una variedad de neoepítomos que pueden ser fuertemente inmunogénicos (Shaw, 2004). En consecuencia, una respuesta autoinmune mediada por IgG o IgM puede originarse en contra de estos neoepítomos, que a su vez pueden cambiar aún más las actividades biológicas de los epítomos y dañar así las estructuras de los ácidos grasos. Algunos de estos auto-antígenos oxidativamente modificados, como es el caso del fosfatidilinositol (PI), un importante componente de la membrana celular, pueden ser determinados (Maes et al., 2007) y de hecho, se han encontrado bajos niveles del mismo en pacientes con depresión (Barkai et al, 1978; Levine et al., 1993). Maes et al., (2007)



publicaron que en la depresión existe una mayor respuesta inmune mediada por IgM dirigida contra PI que en sujetos sanos y que ésta se correlaciona significativa y positivamente con síntomas depresivos como la tristeza y la fatiga. Además, PI es también requerido para el buen funcionamiento del neurotransmisor serotonina que tan relacionado está con la depresión (Akin et al., 2004).

Otros auto-antígenos, generados por oxidación en pacientes con depresión son el ácido oleico, palmítico y mirístico. En este sentido, Maes et al., (2011) han encontrado mayores niveles de anticuerpos IgM contra antipalmitoil, miristoil y oleoil en pacientes con depresión frente a los controles sanos.

#### **1.8.3.4.3. El aumento de los anticuerpos IgM contra neoepítomos nitrados en suero de pacientes deprimidos.**

La evidencia indirecta para la participación de NO en el TDM se deriva de la caracterización de anticuerpos circulantes contra epítomos NO. En este sentido,

Maes et al., (2008a) han encontrado un incremento de los niveles de anticuerpos IgM contra NO-BSA, NO-tirosina, NO-triptófano y NO-arginina en depresión. Estos resultados sugieren que el aumento de NO y/o la activación de las reacciones de nitración de las proteínas, pueden estar involucrados en la fisiopatología de la depresión mayor.

#### ***1.8.3.5. El polimorfismo en los genes de OS y NS en la depresión.***

La literatura ha señalado la existencia de asociaciones significativas entre la depresión y genes de OS y NS, como la ciclooxigenasa- 2 (COX-2) y la SOD, entre otros (Maes et al., 2011).

Un aumento de la actividad de la COX-2 resulta en la generación de radicales libres y de OS y NS (Kuehl y Egan, 1980; Madrigal et al., 2003; Vesce et al., 2007). Se ha detectado un aumento de la expresión de COX-2 en el córtex y en el hipocampo en modelos animales de depresión (Cassano et al., 2006; Guo et al., 2009). El co-tratamiento con antidepresivos e inhibidores de COX-2 ha demostrado ser eficaz como terapia para la depresión (Müller et al., 2006) y para reducir el OS y NS en esta enfermedad (Galecki et al., 2009b). Se ha detectado un polimorfismo de un sólo nucleósido (SNP) G-765C en el promotor del gen de COX-2 (Levy-Lahad et al., 1995). Este polimorfismo se asocia con la actividad del promotor y la expresión de COX-2, de este modo, el homocigoto GG se asocia con un aumento de la expresión de COX-2 (Levy-Lahad et al., 1995). Un estudio ha demostrado que la frecuencia del alelo G y del homocigoto GG es más elevada en sujetos con depresión (Galecki et al., 2010). Por tanto, la inhibición de COX-2 podría ser un buen tratamiento de este trastorno (McGeer y McGeer, 2007).

Shimoda-Matsubayashi et al., (1997) examinaron el papel del polimorfismo funcional SNP Ala-9Val, que da lugar a cambios en la conformación la MnSOD y encontraron una asociación significativa entre los SNP de Ala-9Val e Ile-58Thr, y la expresión mitocondrial de MnSOD. Los estudios que han investigado este polimorfismo en la población con depresión han encontrado resultados contradictorios (Galecki et al., 2010; Pae et al., 2006).

#### **1.8.4. Inflamación y activación del complejo NLRP3-inflamasoma en el TDM.**

##### ***1.8.4.1. Inflamación y citoquinas inflamatorias en el TDM.***

La relación entre la salud mental y la inflamación fue observada por primera vez en 1887 por el psiquiatra y premio Nobel Julius Wagner-Jauregg de la Universidad de Viena. Sin embargo, la inflamación como un posible factor etiopatológico y diana terapéutica de los trastornos del estado de ánimo, fue olvidada durante años con la llegada de los primeros fármacos antidepresivos (tricíclicos, inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) y de la recaptación de serotonina (ISRS) (López-Muñoz y Alamo, 2009). No ha sido hasta las últimas dos décadas cuando se ha retomado el interés por esta relación de la inflamación con los trastornos psiquiátricos, y más concretamente con el trastorno depresivo mayor. En este apartado se describirá brevemente el proceso de la inflamación y la evidencia acumulada sobre su relación con el TDM.

La inflamación es un mecanismo evolutivo beneficioso para mantener la homeostasis en el organismo. La respuesta inflamatoria puede ser apropiada, fisiológica y necesaria en la presencia de una infección, daños o estrés celular, pero también puede ser inapropiada, patológica y dañina cuando se reacciona de forma desproporcionada a un estímulo dado o se reacciona ante estímulos equivocados. En estos casos de inadecuación de la respuesta ante estímulos, la inflamación puede ocasionar potenciales efectos dañinos (Abbas et al., 2012.; Miller et al., 2009). Entre estos efectos dañinos pueden encontrarse alteraciones en el estado de ánimo, en la energía, en el sueño, en la cognición y en la motivación, síntomas todos característicos del TDM. Antes de adentrarnos en estos efectos, se hace necesaria la comprensión de la respuesta inmune y la inflamación.

La respuesta inmune ha sido clasificada tradicionalmente en sistema de respuesta innato (natural) y en sistema de respuesta adaptativo (adquirido). El sistema innato reacciona

con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y con patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) y libera mediadores inflamatorios entre los que se incluyen factores químicos como las prostaglandinas, las histaminas, los leucotrienos y la serotonina, entre otros. Estos factores químicos producen la respuesta inflamatoria local (estimulación del dolor, vasodilatación...), así como atraen a los macrófagos que son los responsables de liberar citoquinas como la interleuquina-1 (IL-1), la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-18 (IL-18) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) para prolongar adicionalmente una respuesta inflamatoria sistémica, e iniciar así, el sistema de respuesta inmune adaptativo a través de leucocitos y linfocitos (Abbas et al., 2012).

La respuesta inmune adaptativa crea y mantiene la memoria del sistema inmunológico. Los linfocitos T desencadenan una respuesta celular citotóxica hacia las células identificadas como potencialmente dañinas (agentes patógenos, células cancerosas...), además de mantener la respuesta inmunológica a través de la liberación de citoquinas, principalmente IL-2, para atraer a más macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Los linfocitos B son atraídos y estimulados por estas citoquinas para producir así una respuesta humoral por la cual se producen anticuerpos contra los patógenos identificados (Abbas et al., 2012).

La inflamación surge entonces como consecuencia de un desbalance producido entre los mediadores pro-inflamatorios tales como las IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 o TNF $\alpha$  entre otras, y los mediadores anti-inflamatorios como IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 o TGF $\beta$  también entre otras, estando los primeros expresados en exceso (Irwin et al., 2007; Blume, et al., 2012, Zorrilla et al., 2001), en respuesta a diferentes PAMPs y DAMPs. Estas citoquinas y factores químicos liberados durante la respuesta inflamatoria pueden utilizarse como buenos biomarcadores para investigar la potencial relación entre los trastornos de la inflamación y del estado de ánimo (Rosenblat et al., 2014).

El papel que juegan la inflamación y las citoquinas en relación al TDM fue sugerido por primera vez en 1980 y desde entonces se han acumulado pruebas en apoyo de esta hipótesis inflamatoria de la depresión (Maes, 1995; Maier et al., 1994). La evidencia que relaciona la inflamación con el TDM proviene de varias observaciones:

- La primera de estas observaciones, hace referencia a la presencia de niveles elevados de marcadores inflamatorios en pacientes con trastorno depresivo mayor. En este sentido, hay estudios que han encontrado en pacientes con depresión, un aumento en los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  (Schiepers et al., 2005; O'Brien et al., 2007). Otros estudios posteriores que han medido las concentraciones de estos marcadores en líquido cefalorraquídeo además de en suero, han encontrado elevados los niveles de la IL-6, el TNF- $\alpha$ , y la proteína C-reactiva (PCR) (Dantzer et al., 2008; Raison et al., 2012, Dowlati et al., 2010, Liu et al., 2012; Dinan, 2009). Otros, han hallado un aumento en suero de la IL-1 $\beta$  y una disminución de los niveles de la IL-10 en pacientes con TDM (Song et al., 2009). La IL-18 también se ha encontrado elevada en estos pacientes (Kokai et al., 2002).
- La segunda, se basa en la concurrencia del TDM con las enfermedades clasificadas como inflamatorias. El TDM se da con una frecuencia de entre 5-10 veces superior en pacientes que adolecen de enfermedades crónicas inflamatorias e inmunológicas, por lo que se las suele considerar como factores de riesgo para la depresión (Shelton & Miller, 2011). Entre estas condiciones inflamatorias se encuentran las enfermedades auto-inmunes (como son la psoriasis, la artritis reumatoide (RA), la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y el lupus eritematoso sistémico (LES)); las enfermedades cardiovasculares; la diabetes; la obesidad y el síndrome metabólico;

así como condiciones inflamatorias más benignas tales como el asma y las alergias (Brydon et al, 2009; Walker et al., 2011).

Hay estudios que han demostrado que la psoriasis aumenta significativamente las tasas de depresión en los sujetos que la padecen (Weigle y McBane, 2013), mientras que la terapia con anti-TNF- $\alpha$  se ha mostrado eficaz en la reducción de los síntomas depresivos independientemente del efecto sobre la gravedad de la psoriasis (Krishnan et al., 2007; Tying et al., 2006).

La artritis reumatoide también se ha asociado con el TDM con mejoría de los síntomas del estado de ánimo tras un tratamiento con fármacos anti-inflamatorios (Covic et al., 2012; Frol et al., 2013; Sato et al., 2013).

También hay estudios que apoyan la relación de la enfermedad inflamatoria intestinal con el TDM (Graff et al., 2009; Walker et al., 1990).

La inflamación es un componente clave en la patogénesis de la aterosclerosis en la enfermedad cardiovascular (Ghattas et al., 2013). Los niveles de PCR (proteína C reactiva) son considerados como un factor de riesgo independiente para el mal pronóstico cardiovascular (Lindahl et al., 2000). Las tasas de TDM son elevadas en los pacientes con enfermedad cardiovascular (Angst et al., 2002; Fenton y Stover., 2006; Osby et al., 2001) ejerciendo esto un impacto negativo en el pronóstico cardiovascular, ya sea a través de factores biológicos(a través de la activación del eje HPA) o de factores psicológicos (mala alimentación, baja adherencia al tratamiento y menos ejercicio) (Fenton y Stover., 2006). Esto señala la existencia de una interacción bidireccional entre los síntomas del estado de ánimo y la enfermedad cardiovascular.

Otras enfermedades que también han demostrado tener una relación bidireccional con el TDM son el síndrome metabólico y la obesidad (McElroy y Keck., 2012;

Morris y Mohammed., 2005). Además, Soczynska et al., (2011) argumentan que el responsable de esta relación es la inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad.

Por último, también existen estudios que han encontrado una asociación entre las alergias y el asma, con síntomas del estado de ánimo (Ahmedani et al., 2013; Sharma et al., 2013; Van Lieshout y Macqueen., 2012). Este aumento de los síntomas depresivos en condiciones inflamatorias más benignas, sugiere que tales síntomas asociados con comorbilidades médicas no se deben simplemente al hecho de sentirse mal por ser diagnosticado de una enfermedad grave, sino que puede tener un carácter más biológico, como puede ser la vía inflamación-estado de ánimo (Rosenblat et al., 2014).

Tomadas en conjunto, estas asociaciones encontradas en los diferentes estudios apoyan aún más el potencial vínculo entre la inflamación y los síntomas del estado de ánimo.

- Una tercera observación proviene del mayor riesgo de sufrir un TDM, tras seguir un tratamiento con citoquinas. Un apoyo para el papel de las citoquinas pro-inflamatorias en la depresión es la observación de que pueden inducir depresión hasta en el 70% de los pacientes tratados con dichos agentes (Maes et al., 2009a).

Numerosos estudios preclínicos llevados a cabo en modelos animales, han puesto de manifiesto que la inducción de un estado inflamatorio, mediante el uso de moléculas pro-inflamatorias como el lipopolisacárido (LPS) y la IL-1, conducirán al desarrollo de la “conducta de enfermedad” un patrón de comportamiento que se caracteriza por asemejarse a la sintomatología depresiva, mostrando letargo, disminución del apetito, aumento del tiempo de sueño, disminución del interés por el sexo, por la exploración social y un aumento de tiempo dedicado a dormir (Dunnet al., 2005).

Hay estudios realizados con seres humanos en los que se ha inducido una respuesta inflamatoria usando vacunas, endotoxinas, LPS, interferón (IFN) e IL-2. De esta manera, Reichenberger et al., (2001) tras inyectar de forma intravenosa la endotoxina *Salmonella abortusequi* a sujetos humanos, encontraron un aumento sérico de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 y de cortisol, indicando esto un estado inflamatorio inducido con éxito, que fue acompañado de cambios en el apetito, alteraciones de la memoria, aumento de la ansiedad y estado de ánimo deprimido, sin mostrar ningún síntoma de enfermedad física. Este efecto de las vacunas se ha demostrado también en otros estudios (Brydon et al., 2009; Strike et al., 2004; Wright et al., 2005). Grigoleit et al., (2011) administraron dosis variables de LPS a sujetos humanos y encontraron una elevación dependiente de la dosis en los niveles de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , cortisol y norepinefrina, que iba acompañada por un consiguiente deterioro de la memoria, aparición de ansiedad y alteración del humor también dosis-dependiente.

Para el tratamiento de la hepatitis C, normalmente se utiliza IFN con el fin de potenciar el sistema inmunológico contra la infección viral (Liang y Ghany, 2013). Se ha encontrado que entorno al 25%-80% de estos pacientes desarrollan un TDM después de iniciar el tratamiento, dependiendo de la dosis recibida (Alavi et al., 2012; Birerdinc et al., 2012; Raison et al., 2005). Lo mismo ocurre con los pacientes con cáncer que reciben terapia con IFN o IL-2 (Capuron et al., 2003, 2004; Eller et al., 2009).

Para resumir, todos estos estudios han puesto de manifiesto que la inducción de un estado pro-inflamatorio en personas sanas o con enfermedades médicas, aumenta los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias y esto en gran medida va acompañado por un aumento de la incidencia de síntomas depresivos, lo que podría sugerir que la inflamación pudiese ser un factor causal de los síntomas del estado de ánimo.



-Una última observación está basada en el efecto de los fármacos antidepresivos sobre la inflamación. En este sentido, la evaluación desde una perspectiva anti-inflamatoria de los fármacos antidepresivos tradicionalmente utilizados para el tratamiento del TDM, ha arrojado resultados contradictorios. Hay estudios que describen que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se reducen a la normalidad tras un tratamiento con antidepresivos (Dahl et al., 2014; Kenis y Maes, 2002). Mientras que otros trabajos no encuentran este efecto de los antidepresivos sobre los marcadores inflamatorios (Jazayeri et al., 2010; Maes et al., 1995b) o incluso, hay alguno que señala un efecto pro-inflamatorio tras el tratamiento crónico con estos fármacos en animales (Lee et al., 2007, 2010; Porterfield et al., 2011). Por este motivo, hay que concluir que si bien estos tratamientos tradicionales pueden tener algún efecto anti-inflamatorio, son necesarias más investigaciones para buscar otros agentes que puedan ser dirigidos de forma más específica hacia esta vía inflamatoria.

Como acabamos de ver, existe una amplia evidencia que apoya el papel de la inflamación como posible factor etiológico de la depresión mayor. Además, se ha mostrado repetidamente que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias están elevados en personas diagnosticadas de TDM. Además, hay destacar que estas citoquinas han demostrado tener un efecto sobre: los niveles centrales de serotonina, actuando a múltiples niveles para disminuirlos (Capuron et al., 2001, 2003; Zhang et al., 2001); sobre el eje hipotálamo-hipófisis- adrenal, aumentando su actividad y por consiguiente, la liberación de las hormonas CRH, ACTH y provocando insensibilidad a los glucocorticoides (Beishuizen y Thijs., 2003; Silverman et al., 2004; Brydon et al., 2009; Pace y Miller, 2009; Steensberg et al., 2003); sobre la activación de las células microgliales, aumentando la misma (Harry y Kraft., 2012; Stertz et al., 2013); y sobre el deterioro de la neuroplasticidad (

Karunakaran y Park., 2013; Miller et al, 2009, 2013; Raison y Miller., 2003, 2013).

Siendo todas éstas, vías que han sido implicadas en la patogénesis de la depresión.

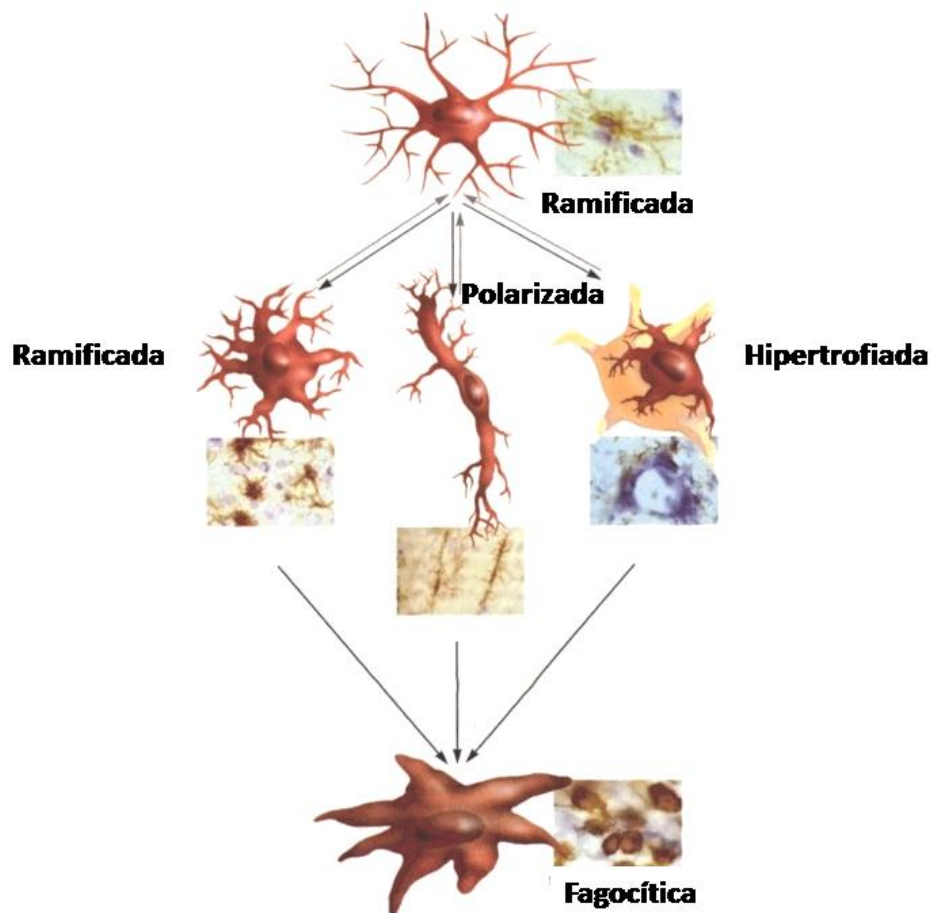
Antes de finalizar, otro aspecto importante a destacar en esta relación entre el estado de ánimo y la inflamación, es el posible efecto que la tensión psicológica puede ejercer sobre la inflamación. En un meta-análisis llevado a cabo por Steptoe et al. (2007), el estrés psicológico se asoció con una respuesta inflamatoria aguda reflejada por una elevación de las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6; TNF- $\alpha$  y PCR (Steptoe et al., 2007). En la actualidad, esto no resulta novedoso, ya que se ha documentado ampliamente que el estrés, ya sea físico o psicológico, puede provocar una respuesta inflamatoria (Abbas et al., 2012; Miller et al., 2013; Raison y Miller., 2013). Esto sugiere que el vínculo existente entre los trastornos del estado de ánimo y la inflamación es de naturaleza bidireccional, entendiendo que la inflamación puede inducir síntomas depresivos y viceversa.

#### ***1.8.4.2. Activación de la microglía en el TDM.***

La inflamación en el sistema nervioso, o neuroinflamación, está fuertemente asociada con la activación microglial. Las microglías son las células del SNC que primero se activan en respuesta al daño de los tejidos o infecciones del cerebro (Stern et al., 2013). Entre las funciones que desempeña la microglía se encuentran, entre otras: el reconocimiento de patógenos, la fagocitosis, la presentación de antígenos, y la remodelación sináptica (Réus et al., 2015). En condiciones fisiológicas normales, la microglía no activada o "microglía en reposo" se encuentra vigilando el ambiente que le rodea (Nimmerjahn et al, 2005; Marshall et al, 2013), activándose de forma inmediata mediante cambios en su morfología o función, en respuesta a cambios sucedidos en el ambiente que les rodea (Marshall et al., 2013). Entre los activadores de la microglía se encuentran diferentes moléculas como el receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) y los constituyentes endógenos que son liberados

por las células dañadas, como la ATP, histonas y proteínas de choque térmico (HSP), y las moléculas S100, conocidos todos como DAMPS (Lu et al, 2014; Wiersinga et al, 2014). Se diferencian dos tipos de activación microglial: la M1 o activación clásica y una activación M2 alternativa. En la activación M1, la microglia puede llegar a ser hiper ramificada o ameboide/fagocítica (Boche et al., 2013) y puede sintetizar citoquinas proinflamatorias (como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e IL-6, entre otras) radicales superóxido, glutamato (Barger et al., 2007; Takaki et al., 2012), NO en el intento de reparar los tejidos y eliminar infecciones. La activación de M2 que puede desencadenarse por la intervención de citoquinas como IL-4, IL-13 o IL-25 (Boche et al, 2013; Maiorino et al., 2013), va asociada con la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), IL-10; el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factores neurotróficos (Ekdahl, 2012; Boche et al., 2013; Hu et al., 2015), que favorecen la recuperación y limitan la lesión de la neuronas (Najjar et al., 2013). El tipo y la magnitud de la lesión, entre otros factores, pueden estar influyendo en el desarrollo de un tipo u otro de fenotipo (Marshall et al., 2013). Además de esta clasificación, también se ha propuesto un nivel gradual de activación microglial (**Figura 3**), en el cual las células pueden ir pasando gradualmente desde una etapa de reposo, a una de alerta, a una fagocítica, para finalizar en una etapa de activación, lo que puede diferenciarse por las características morfológicas y los niveles de citoquinas y factores de crecimiento secretados (Raivich et al., 1999). Estudios recientes, han relacionado las alteraciones en el número y/o la morfología de células microgliales con los cambios cognitivos y conductuales presentes en los trastornos psiquiátricos (Nakagawa y Chiba, 2014; Watkins et al, 2014; Najjar y Pearlman, 2015). Bien conocida es ya la contribución del estrés psicológico al desarrollo de la depresión, y la evidencia de estudios preclínicos han sugerido un papel de la microglia en la depresión y el estrés.

Hay estudios que demuestran la activación de la microglía en modelos experimentales de roedores sometidos a estrés (Sugama et al., 2007). El antibiótico minociclina, se ha mostrado eficaz en la reducción de la activación de la microglía en ratas sometidas a estrés (Soczynska et al, 2012; Reus et al., 2015b). Estos hallazgos apoyan la teoría de que la microglía desempeña un importante papel en la modulación de los efectos del estrés (Hinwood et al., 2012).

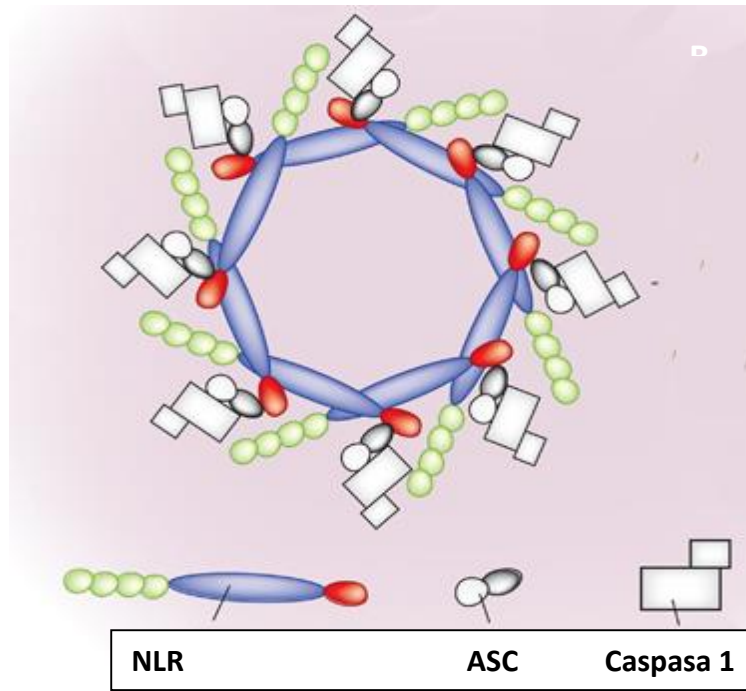


**Figura 3.** Clasificación de la microglía según el estado de activación. Fuente. Células de la glía de R. Douglas Fields.

#### ***1.8.4.3. Activación del complejo NLRP3-Inflamasoma en el TDM.***

Existe una amplia evidencia que apoya el papel de la inflamación como posible factor etiológico de la depresión mayor. Además, se ha mostrado repetidamente que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias están elevados en personas diagnosticadas de TDM. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se producen estos procesos inflamatorios aún no están claros.

En los últimos años, las IL-1 $\beta$  e IL-18 han adquirido mucha relevancia por su implicación en diversas patologías y su relación con algunas caspasas implicadas en la inflamación y la apoptosis como es el caso de la caspasa-1. Esta interacción constituye las bases de un nuevo factor inflamatorio conocido como complejo inflamasoma. El inflamasoma es un complejo multiprotéico que está constituido por un sensor intracelular, que por lo general es un receptor Nod-like (NLR), un precursor de la pro-caspasa-1 y por el adaptador de ASC (**Figura 4**). La activación de este complejo induce la maduración de la caspasa-1 y el procesamiento de sus sustratos, IL-1 $\beta$  e IL-18. Los NLRs son receptores localizados en el citosol, entre cuyas funciones se encuentran la regulación de la inflamación y de la apoptosis. Están formados por tres dominios en la región amino-terminal, encargados de mediar la transducción de la señal y/o la activación de caspasas inflamatorias como la caspasa-1. En la región central, presentan un dominio de unión a nucleótidos responsable de la oligomerización (NOD) dependiente del ATP, y en la región carboxi-terminal, presenta una secuencia repetitiva rica en leucinas conocida como LRR (Leucine Rich Region), a través de la cual se une a ligandos específicos. La familia de NLR se compone de una gran variedad de miembros, de todos ellos NLRP3 es el más estudiado y se activa por una amplia gama de señales de estrés celular. A este respecto, se ha demostrado que los ROS y la disfunción mitocondrial son importantes activadores de la inflamación mediada por inflamasoma (Zhou et al., 2011; Shimada et al., 2012).



**Figura 4.** Estructura del complejo inflammasoma. A. Hélice formada por la unión de una proteína NLR, el precursor de la pro-caspasa-1 y el adaptador de ASC. Modificado de Elinav et al., 2013

Varias son las razones que llevan a proponer el papel central que puede desempeñar el complejo NLRP3-Inflamasoma como inductor de los procesos inflamatorios que conducen al desarrollo del TDM. La primera de estas razones se basa en la presencia de niveles elevados de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 en los pacientes diagnosticados de depresión mayor, siendo éstas precisamente las principales citoquinas activadas por el complejo inflammasoma (Ogura et al., 2006). Otro motivo que lleva pensar en la implicación de este complejo, ha sido el hecho de que la IL-1 $\beta$  induce una activación del eje HPA (Turnbull y Rivier, 1999; Berkenboschet al., 1987; Maes et al., 1993; Sapolsky et al., 1987; Tominagaet al., 1991) que se sabe que está desregulado en pacientes deprimidos. Otra de estas razones hace referencia a que determinadas enfermedades inflamatorias crónicas tales como la diabetes o la artritis reumatoide que tienen altas tasas de comorbilidad con la depresión, también presentan activación del complejo NLRP3-Inflamasoma (Evans et al., 2005; Mason et al., 2012). Hay estudios que describen que el

bloqueo de IL-1 $\beta$  es suficiente para bloquear las respuestas de comportamiento y procesos celulares depresivos que se producen como consecuencia de la exposición al estrés crónico en roedores (Koo et al., 2008) y esto se convierte en una razón más para pensar en la implicación del complejo inflamasoma en la depresión mayor. Y la última de estas razones se basa en la hipótesis de que la IL-1 $\beta$  es el primer paso en las respuestas pro-inflamatorias al estrés psicológico y resulta en una cascada de citoquinas pro-inflamatorias (Iwata et al., 2012), y como ya hemos mencionado el complejo NLRP3-Inflamasoma es el principal regulador de la IL- $\beta$ .

Como se ha descrito, a pesar de que existen numerosos trabajos que apoyan la hipótesis de que la inflamación está involucrada en la etiopatogenia del TDM, los mecanismos que conducen a esta inflamación permanecen sin dilucidar. Por esto, en nuestro trabajo se examina un aspecto novedoso en relación a los procesos de immuno-inflamación en la respuesta de estrés y la depresión, y es el hecho de que el complejo NLRP3-Inflamasoma pueda constituir un puente entre el estrés psicológico y la depresión, y de que pueda suponer un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos para el TDM.





## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Nuestro estudio pretende demostrar la implicación del complejo NLRP3-Inflamasoma en la fisiopatología del TDM. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la posible activación del complejo NLRP3-Inflamasoma en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), así como la implicación del estrés oxidativo en la activación de este complejo.
- Estudiar el papel del complejo NLRP3-Inflamasoma en el SNC, en un modelo murino de depresión inducida por estrés.
- Determinación del efecto de los fármacos antidepresivos en la inhibición del complejo NLRP3-Inflamasoma.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

El estudio con pacientes se realizó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Sevilla, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y todas las Conferencias Internacionales de Armonización y Guías de Buenas Práctica Clínicas. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de comenzar el estudio.

Los estudios en animales fueron realizados de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE) y la normativa española para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos (RD 53/2013 sobre el cuidado de los animales de experimentación: BOE 02/08/2013). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité institucional local del cuidado de los animales.

#### **3.1. Pacientes.**

Nuestro primer estudio en humanos contó con dos grupos experimentales y uno control. El primero de los grupos experimentales estuvo constituido por un grupo de veinte pacientes diagnosticados de depresión mayor melancólica según los criterios diagnósticos del DSM-IV (Código DSM-IV: F33) que se encontraban en el primer episodio depresivo y que no habían recibido aún ningún tratamiento. El diagnóstico fue establecido mediante entrevista personal de acuerdo a los criterios diagnósticos del DSM-IV. El segundo de los grupos experimentales estaba formado por veinte pacientes con el mismo diagnóstico clínico que el anterior, con la diferencia de que estos ya estaban siguiendo un tratamiento con el antidepresivo tricíclico amitriptilina durante un mínimo de 10 meses consecutivos, en las dosis que fueron consideradas efectivas por sus médicos. Estas dosis fueron muy homogéneas ( $62,5 \pm 12$  mg / día). Ambos grupos de pacientes fueron reclutados después de un primer episodio depresivo por el Servicio de Psiquiatría del Hospital Virgen

Macarena de Sevilla, España. Todos los pacientes fueron evaluados además utilizando el Inventario de Depresión de Beck (BDI) ( $41,5 \pm 8,3$  es la media de todos los pacientes deprimidos). Cualquier intento de suicidio se registró en todos los pacientes. Pocos hombres fueron incluidos en este estudio debido a la baja cantidad de hombres afectados por depresión mayor en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Virgen Macarena en el momento del estudio. Los pacientes en tratamiento con amitriptilina se mantuvieron estables según lo confirmado por el seguimiento de consultas externas de la unidad. Todos los pacientes tenían al menos 18 años de edad (la edad y el sexo están especificados en la **Tabla 1**), y, o bien ellos o sus representantes legales dieron su consentimiento informado para ser incluidos en el estudio. Finalmente se incluyó un grupo control de 20 voluntarios sanos (5 hombres y 15 mujeres) coincidentes con el rango de edad, el género, el origen étnico y la demografía de los pacientes reclutados (**Tabla 1**).

Los criterios de inclusión y exclusión que debían cumplir los pacientes participantes del estudio fueron:

-Criterios inclusión: 1) Pacientes diagnosticados de depresión mayor según criterios DSM-IV 2) Que presten su consentimiento por escrito a participar en el estudio.

- Criterios de exclusión: 1) Pacientes con patología reumática concomitante (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico, artropatías microcristalinas o artrosis). 2) Enfermedad sistémica (cardio-pulmonar, neurológica, renal, febril) significativa. 3) Enfermedad grave que pueda impedir el desarrollo del estudio o evaluación de los resultados. 4) Pacientes con psicopatología grave (esquizofrenia, riesgo de autolisis), con dependencia de sustancias psico-activas, o con enfermedad que pudiese dar lugar a síntomas depresivos (alteración de la glándula tiroidea, cáncer, anemia...). 5) Pacientes en litigio por reclamación de invalidez, etc, relacionado o no con la enfermedad. 6) Pacientes que no puedan acudir a las visitas



necesarias para llevar a cabo el estudio. 7) Pacientes que se nieguen a participar o a firmar el consentimiento informado.

Para la evaluación del efecto de los antidepresivos en el complejo inflammasoma se tomó una muestra de 194 sujetos (**Tabla 2**) diagnosticados de depresión mayor que habían sido tratados con diferentes antidepresivos. De estos sujetos, 20 fueron tratados con 40mg/día de fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina, ISRS), 17 fueron tratados con 40 mg/día de paroxetina (ISRS), 18 con 30 mg/día de mianserina (TeCA), 15 con 30 mg/día de mirtazapina (TeCA), 20 sujetos con 30 mg/día de venlafaxina (Inhibidor de la recaptación de la serotonina y la noradrenalina, IRSN), 21 fueron tratados con 50 mg/día de desvenlafaxina, 20 sujetos fueron tratados con 25 mg/día de amitriptilina (antidepresivo tricíclico, TCA), otros 20 con 50 mg/día de imipramina (TCA) y por último, 18 con 25 mg/día de agomelatina. Y se compararon con un grupo de 20 personas con el mismo diagnóstico de depresión mayor pero que no habían recibido ningún tratamiento con antidepresivos y con un grupo control de sujetos voluntarios sanos con características sociodemográficas, edad y sexo similares a los sujetos con diagnóstico de depresión mayor.

### **3.2. Evaluación de los pacientes.**

En el mismo día, tras informar al paciente y firmar el consentimiento informado y previamente a la realización de la extracción sanguínea, se realizó la evaluación clínica de los pacientes utilizando los siguientes instrumentos:

-Inventario de Depresión de Beck (BDI). Concretamente, se ha utilizado la versión adaptada y traducida al castellano por Vázquez y Sanz (1991). Se trata de un cuestionario auto-aplicado de 21 ítems que evalúa un amplio espectro de síntomas depresivos. Se sistematizan 4 alternativas de respuesta para cada ítem, que evalúan la gravedad/

intensidad del síntoma y que se presentan igualmente ordenadas de menor a mayor gravedad. El marco temporal hace referencia al momento actual y a la semana previa. El paciente tiene que seleccionar, para cada ítem, la alternativa de respuesta que mejor refleje su situación durante el momento actual y la última semana. La puntuación total se obtiene sumando los valores de las frases seleccionadas que van de 0 a 3. El rango de la puntuación obtenida es de 0-63 puntos. Los puntos de corte usualmente aceptados para graduar la intensidad/severidad son los siguientes:

No depresión: 0-9 puntos.

Depresión leve: 10-18 puntos.

Depresión moderada: 19-29 puntos.

Depresión grave: más de 30 puntos.

A efectos de selección de sujetos para investigación, el punto de corte usualmente aceptado es  $> 21$  puntos.

-Entrevista clínica basada en criterios diagnósticos DSM-IV. Entrevista realizada según protocolo del Área de Salud Mental Macarena, donde se recogen las variables clínicas más relevantes de cada paciente (duración de la enfermedad, número de episodios depresivos, gravedad, etc).

### **3.3. Fármacos y reactivos.**

Los reactivos fluoxetina, paroxetina, mianserina, mirtazapina, venlafaxina, desvenlafaxina, amitriptilina, imipramina, agomelatina, minociclina y coctel inhibidor de proteasas, junto con el ATP fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El anticuerpo anti- GAPDH anticuerpo monoclonal de Calbiochem - Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, Reino Unido). Mitosox<sup>TM</sup> fue adquirido de

Invitrogen / Molecular Probes (Eugene, Oregón). El anticuerpo anti caspase-1 activa se adquirió en Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti - NLRP3 de Adipogen (San Diego, EE.UU.) y anti -IL - 1 $\beta$  (p17) de Santa Cruz de Biotecnología. El kit de sustrato Immun Star HRP era de Bio -Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

### **3.4. Líneas celulares.**

Para los ensayos celulares utilizamos la línea celular THP-1 que fueron cultivadas a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en el medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, antibiótico/solución antimicótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), y suero bovino fetal al 10%. Las células THP-1 fueron cultivadas con ATP 5 mM durante 6 y 12h con y sin amitriptilina a concentraciones 0,5, 1 y 5 M. Durante este período de tiempo, el medio no fue renovado para poder determinar la presencia de las interleuquinas en el mismo.

Para la evaluación del efecto de los antidepresivos, las células THP-1 se cultivaron con ATP a una concentración 5 mM durante 12h con y sin la adición de fluoxetina, paroxetina, mianserina, mirtazapina, venlafaxina, desvenlafaxina, amitriptilina, imipramina o agomelatina 1 $\mu$ M.

### **3.5. Muestras sangre.**

La recogida de muestras sanguíneas se hizo de forma ambulatoria en el Área de Psiquiatría del Hospital Virgen Macarena mediante punción venosa con Vacutainer en condiciones de esterilidad, en tubos con anticoagulante EDTA. Se tomaron 16 ml de sangre a cada paciente. Tras la extracción de sangre coagulada, estas muestras fueron centrifugadas a 3800 g durante 5 min, y el suero se almacenó a – 80° C hasta la realización del ensayo.

### **3.6. Aislamiento de PBMC mediante Ficoll-Paque™ PLUS.**

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizó el protocolo basado en la utilización del polisacárido hidrofílico Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS. Para este protocolo usamos entre 2,5 - 3 ml de sangre heparinizada y mezclada con 1,5 ml de solución salina equilibrada (BSS, Balanced Salt Solution), una solución salina con glucosa que mantenía la viabilidad de las células sanguíneas. Para cada 2 ml de sangre con BSS, se utilizó 1,5 ml de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS. El primer paso consistía en introducir el Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS dentro de un tubo Corning de 15 o 50 ml, dependiendo del volumen de sangre obtenido. A continuación, la sangre se introducía lentamente con una pipeta Pasteur, evitando que se mezclase con la capa de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS. Posteriormente se centrifugó a 900 g en una centrífuga basculante durante 40 min. Tras la centrifugación se observó la separación de los componentes de la sangre, una fase superior amarilla de plasma, seguida de una interfase que contenía los monocitos y linfocitos (PBMC) situada encima del Ficoll y, finalmente, un precipitado formado por plaquetas, eritrocitos y demás fragmentos celulares. Recogimos la interfase formada por monocitos y linfocitos con una pipeta Pasteur, y se pasaron a un nuevo tubo Corning, donde por cada mililitro de células recogidas se añadieron 3 ml de tampón BSS, se invirtió y se centrifugó a 900 g durante 10 min para eliminar las plaquetas y limpiar las PBMC.

### **3.7. Animales para ensayos *in vivo*.**

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones macho C57/BL6/J de ocho semanas de edad con un peso de entre 25-30 g. Estos ratones se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Igualmente se usaron ratones machos noqueados para el gen NLRP3 (NLRP3 <sup>-/-</sup>), con fondo genético C57/BL6/J, de ocho semanas de edad con un peso de entre 25-30 g. Estos ratones fueron aportados por el Dr. Bernhard Ryffel (INEM - UMR7355 - CNRS - University of Orleans). Para evitar los efectos de la consanguinidad, cada grupo provenía de diferentes camadas. Tras los ensayos, los ratones fueron

anestesiados con CO<sub>2</sub> y se sacrificaron por decapitación. Se tomaron muestras de sangre para aislamiento de suero mediante centrifugación a 3800 g durante 5 min, y el suero se almacenó a – 80° C hasta la realización del ensayo. Para la extracción de tejido nervioso, los ratones fueron perfundidos mediante inyección de suero fisiológico por punción intracardíaca. Tras la perfusión, los cerebros fueron extraídos y seccionados en sus dos hemisferios. Uno de los hemisferios se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% y de la otra mitad se disecaron la corteza prefrontal y el hipocampo. Además, se aislaron las secciones de hipocampo y corteza prefrontal. Previamente, los ratones fueron perfundidos mediante inyección de suero fisiológico por punción intracardíaca.

Para los experimentos de minociclina los ratones fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes cuatro grupos: grupo de animales estresados tratados con solución salina, grupo de animales estresados tratados con el fármaco (minociclina), grupo de animales no sometidos a estrés tratados con solución salina, o grupo de animales no sometidos a estrés tratados con minociclina. Los ratones recibieron inyecciones diarias intraperitoneales de minociclina (10 mg / kg; Sigma-Aldrich) o del vehículo sólo (PBS) en función del grupo al que correspondiesen, durante los 30 semanas que duró el período de estrés.

### **3.8. Pruebas para la determinación del comportamiento depresivo en animales:**

#### **3.8.1. Modelo de Restraint stress (RS).**

El ensayo de estrés crónico por inmovilización, representa un paradigma de inducción de depresión aceptable en roedores. Se considera que el RS activa la respuesta al estrés a través de circuitos límbicos (Herman y Cullinan, 1997). La inmovilización tiene una combinación de elementos psicogénicos y neurogénicos que sugiere que el estrés por inmovilización resulta en cambios morfológicos, neuroquímicos y funcionales que se

distribuyen ampliamente en el cerebro (McIntyre *et al.*, 1999). Para producir este estrés crónico por inmovilización, los ratones fueron confinados en tubos cónicos de 50 ml con pequeñas perforaciones para permitir la ventilación, en posición horizontal, durante 2 horas cada día, un total de 30 días consecutivos. Durante este período de 2 h de estrés por inmovilización, tanto los grupos estresados como los de control fueron privados de comida y agua. Transcurridas las 2 horas, se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* y su ingesta se monitorizó diariamente. La inmovilización se realizó a la misma hora cada día hasta el día antes del sacrificio. Los ensayos de comportamiento se llevaron a cabo 4 días antes del sacrificio, por lo que durante esos cuatro días primero se realizaba la inmovilización y 3 horas después se hacía la prueba de comportamiento pertinente.

### **3.8.2. Prueba de natación forzada.**

La Prueba de Natación Forzada (PNF) (Porsolt *et al.*, 1977b), consiste en someter a los animales experimentales a una situación aversiva de la que no pueden escapar. Actualmente, la PNF, es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento depresivo en roedores.

En nuestros ensayos, los ratones fueron colocados individualmente en un recipiente cilíndrico de vidrio transparente de 2 litros de capacidad (19 cm de altura) lleno hasta una profundidad de 13 cm con agua a 23 ° C, y fueron sometidos a una sesión de 6 minutos de inmersión en agua. Los periodos de inmovilidad de los sujetos experimentales, fueron anotados por un observador ciego al tratamiento que recibían los ratones, teniéndose en cuenta únicamente la inmovilidad producida entre el minuto 2 y el 6 de la sesión. Dicha inmovilidad fue definida como la ausencia total de movimiento de las extremidades superiores e inferiores, o el mínimo movimiento posible de las mismas para mantenerse a flote.

### 3.8.3. Interacción social.

Este procedimiento, propuesto por File y Hyde (1978), fue ideado para medir la conducta ansiosa en las ratas. Posteriormente se ha adaptado para medir dicha conducta en los ratones (KrsiaK et al., 1990; Egashira et al., 2007). El protocolo original consiste en colocar una pareja de ratas en un ambiente no familiar, en ciertas condiciones de iluminación (alta o baja iluminación). Durante la observación de sus conductas, se van tomando medidas de los patrones de interacción social y locomoción que se establecen entre ellos. File y Hyde (1978, 1979), defienden que ciertas conductas sociales, como pueden ser el olfateo, el aseo, el seguimiento, el golpeo, la lucha, el salto, y echarse sobre el congénere, pueden verse inhibidas cuando se incrementa la ansiedad manipulando factores ambientales (una habitación no familiar o una iluminación elevada). Como uno de los síntomas de la depresión es la disminución del interés por mantener contactos sociales, muchos estudios utilizan este test para medir este aspecto de la conducta depresiva en ratones.

En nuestro trabajo, la interacción social en parejas se realizó en una jaula de pruebas neutral (caja gris de Plexiglás, de 30 cm × 30 cm × 30 cm). Las condiciones de iluminación de la sala permanecieron constantes durante todos los ensayos (luz blanca de 60W). Previamente, cada ratón había sido habituado a la jaula de prueba dejándole en ésta durante 10 minutos dos días consecutivos. Un día después de la última prueba de habituación, dos ratones del mismo genotipo (el de la prueba y el ratón no familiar) fueron colocados juntos en la misma jaula de pruebas y su tiempo de interacción se registró durante un período de 10 minutos. Se midió el tiempo que los animales empleaban en las conductas consideradas de interacción (olfateo, aseo, seguimiento, golpeo, lucha, salto, y echarse sobre el congénere). En este protocolo no se observó el comportamiento agresivo.

El tiempo de interacción se cuantificó por dos observadores ciegos a los tratamientos y previamente entrenados.

#### **3.8.4. Test de consumo de sacarosa.**

Teniendo en cuenta el valor apetitivo y de refuerzo primario que tienen las soluciones dulces, el consumo de sacarosa se ha utilizado para evaluar la conducta hedónica en ratones. Como se ha definido anteriormente, la anhedonia es uno de los síntomas fundamentales para el diagnóstico de episodio depresivo. En este sentido, la anhedonia se define operacionalmente como una baja sensibilidad a la recompensa o una elevación de los umbrales de refuerzo positivo, y se ha asociado en la mayoría de los estudios con una bajada del consumo de bajas concentraciones (0,1%-2%) de sacarosa (Kompagne et al., 2008).

En nuestro estudio, tres días antes del ensayo los ratones fueron habituados a una solución que contenía sacarosa al 1% con agua durante 24 h, sin previa restricción de comida y posteriormente se les sustituyó la solución por agua durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se privó a los animales de fluidos durante toda la noche y a la mañana siguiente, se les presentó a los ratones dos botellas una de las cuales contenía agua con 1% de sacarosa y la otra agua sin sacarosa, durante 24 h se midieron los volúmenes consumidos. El consumo fue medido por el peso del bebedero antes y después de las 24 horas de evaluación. La cantidad de sacarosa consumida se normalizó a la del agua para cada animal.

#### **3.8.5. Consumo de alimento.**

Como ocurre con el consumo de sacarosa, la ingesta de alimento también tiene carácter de reforzador primario positivo, y la disminución de su consumo, reflejaría igualmente, la anhedonia del animal y el posible estado depresivo. Los estudios experimentales



demuestran que, de forma general, la estimulación estresante más suave podría inducir hiperfagia mientras que los estímulos estresantes más severos inducirían hipofagia (Silveira et al., 2000).

Inmediatamente después del periodo de modelación de estrés por inmovilización (30 días), se les permitió a los ratones acceso *ad libitum* a la comida durante 24, 48 y 72 horas en un bol de vidrio de 6 cm de diámetro x 1,5 (de altura). El consumo de alimentos se calculó como la media de las diferencias en el peso de la comida antes y después del período de estrés, presentando los resultados en relación al consumo de comida de los animales no sometidos a estrés.

### **3.9. Análisis de proteínas mediante Western-Blot.**

#### **3.9.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.**

Para cuantificar la cantidad de proteínas para los ensayos de Western-Blot hemos usado una modificación del método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) ideada para muestras que contienen membranas (Stoschek, 1990). El ensayo se realizó añadiendo en una cubeta de espectrofotómetro 50  $\mu$ l de NaOH 1M, 20  $\mu$ L de la muestra y 1 ml de reactivo de Bradford. Tras dejar incubar la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro UniCam UV 500 (Thermo Spectronic). La cantidad de proteína fue determinada mediante una recta patrón realizada con cantidades conocidas de inmunoglobulina G (0-28  $\mu$ g).

#### **3.9.2. SDS-Page y Western-Blot.**

El análisis de las proteínas que estaban presentes en los tejidos lisados y células se efectuó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Laemli (Laemli, 1970), a una intensidad de 35 V por cada gel

en un sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y con tampón de carrera TGS10X (Tris/Glycine/SDS Buffer 10X, BioRad). Para ello, preparamos geles de diferentes concentraciones de acrilamida de acuerdo a las necesidades del peso molecular de las proteínas a estudiar y al 4% el gel condensador. Realizamos la electroforesis a 120 V en tampón de electroforesis TGS (Tris/Glicina/SDS, Bio-Rad). Tras la electroforesis se procedió a la transferencia (Trans-Blot, SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación Bio-Rad Power Pac 1000) a 25V y durante 45 minutos en tampón de transferencia TG (Tris/Glycine Buffer 10X, BioRad). Se usaron membranas de Nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). A continuación de la transferencia, para comprobar que la misma se ha realizado correctamente, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de Rojo Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1%. Después de desteñir el rojo Ponceau con ácido acético 1%, las membranas fueron bloqueadas con TTBS (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn-20 0,05%)+Leche 0,5% a 4°C durante 16 horas.

### **3.9.3. Inmunodetección con anticuerpos.**

Las membranas ya bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en TTBS (TBS, Tween-20 al 0.05%, agua destilada y leche en polvo). Seguidamente, lavamos las membranas tres veces durante 5 minutos cada lavado, en TTBS (TBS, Tween-20 al 0.05%, agua destilada). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario, el cual, está marcado con peroxidasas de rábano HRP para catalizar la oxidación del luminol en presencia del peróxido de hidrógeno, durante 2 horas en TTBS (igual que el primario). Posteriormente, se realiza la detección de la proteína por quimioluminiscencia usando el kit comercial immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad Laboratories) y películas fotográficas CL-

Xposure<sup>TM</sup>Film (Clear Blue X-Ray Film, Pierce). La imagen de Western blot se cuantificó utilizando el software ImageJ (ver: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

### **3.10. Niveles IL-1 $\beta$ e IL-18.**

Los niveles de IL-1 $\beta$  (Genway, San Diego CA, EE.UU.) e IL-18 en suero (Biosensis, Australia) se analizaron por duplicado por kits ELISA comerciales. Brevemente, el procedimiento consistió en pipetear en una placa multipocillos cuyos pocillos estaban revestidos de un anticuerpo específico para la IL-1 $\beta$ , 100  $\mu$ l de suero de cada sujeto y se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación y los lavados correspondientes, se procedió a una incubación con un segundo anticuerpo biotinilado durante una hora. En la primera incubación, el antígeno IL-1 $\beta$  se une de forma simultánea al anticuerpo inmovilizado en un sitio, y al anticuerpo biotinilado en un segundo sitio. Después de la eliminación del exceso de este segundo anticuerpo, se añadió la enzima estreptavidina-peroxidasa. Ésta se une al anticuerpo biotinilado para completar el sándwich de cuatro miembros. Después de una incubación y del lavado para eliminar toda la enzima no unida, se añadió una solución de sustrato, que actúa sobre la enzima unida para producir color. Finalmente las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (iMark microplate, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450nm. La intensidad de este producto coloreado es directamente proporcional a la concentración de IL-1 $\beta$  presente en las muestras.

Para la determinación de los niveles de IL-18, se utilizó igualmente un Kit de ELISA (Biosensis, Australia), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se añadieron 100  $\mu$ l de cada muestra en una placa previamente revestida con un anticuerpo monoclonal específico para IL-18 y se incubaron durante una hora. Durante esta primera incubación, IL-18 es capturado e inmovilizado sobre la placa. Después del lavado, un conjugado de

peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-IL-18 anticuerpo fue pipeteado en los pocillos, e incubado durante una hora. La unión del anticuerpo conjugado HRP a los pocillos completa el sándwich de tres miembros. Tras el lavado, la actividad de HRP es detectada mediante la incubación del reactivo de sustrato TMB durante 30 minutos. La incubación del reactivo de sustrato dentro de los pocillos produce un color que es proporcional a la cantidad de IL-18 contenida en la muestra. Tras el período de incubación, la reacción se paró añadiendo a cada pocillo una solución que termina la reacción catalizada por HRP y estabiliza el color formado. La absorbancia de cada pocillo se midió a 450 nm utilizando un lector de placa iMark microplate, Bio-Rad.

### **3.11. Niveles de ATP.**

Los niveles de ATP se determinaron en homogenados celulares mediante un ensayo de bioluminiscencia utilizando un kit de determinación de ATP (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit consiste en el requerimiento de ATP por la luciferasa para la producción de luz, por lo que a mayor contenido de ATP de la muestra, mayor emisión de luz. Para ello, en los ensayos se mezclaron cantidades proporcionales de una solución de reacción que contenía luciferasa de luciérnaga recombinante y su sustrato D- luciferin, con los homogenados de tejido, para medir posteriormente la luminiscencia emitida con un luminómetro modelo Luminoskan TL Plus (Thermos Lab Systems) a una longitud de onda de 560nm. Para la cuantificación final, se realizó una recta de calibrado con muestras de ATP de concentración conocida.

### **3.12. Producción mitocondrial de ROS.**

La generación mitocondrial de ROS en células THP-1 se determinó por citometría de flujo utilizando MitoSOX™, un indicador de anión superóxido mitocondrial. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se incubaron con 1μM MitoSOX™ durante 30 min a

37°C, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 500 ml de PBS para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo en un citómetro Epics XL, Beckman Coulter, Brea, California, EE.UU. (excitación a 510 nm y detección de fluorescencia a 580 nm).

### **3.13. Determinación de la peroxidación lipídica.**

Los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma, células o tejidos fueron determinados por un método basado en la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) a 90-100°C. La peroxidación de lípidos en las células fue estimada mediante el análisis de la acumulación de lipoperóxidos con el kit comercial OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) de Cell Biolabs Inc. (Arjons DriveSan Diego, USA). Las TBARS se expresan en términos de niveles de malondialdehído (MDA). En estos ensayos, un estándar MDA se utiliza para construir una curva estándar contra la que las muestras desconocidas se pueden trazar.

El Kit de ensayo para sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es una herramienta para la medición cuantitativa directa de MDA en las muestras biológicas. La cantidad desconocida de MDA que contienen las muestras o estándares de MDA se hacen reaccionar primero con TBA a 95°C. Después de una breve incubación, las muestras y los estándares pueden ser leídos o bien por espectrofotometría o fluorométricamente. El contenido de MDA en las muestras desconocidas se determina por comparación con la curva estándar MDA predeterminada.

Para realizar el protocolo, en primer lugar, se añadió por duplicado 100 µl de las muestras (homogenados o suero) en tubos Eppendorf independientes. Seguidamente se añadió 100µl del reactivo SDS Lysis Solution a cada uno de estos Eppendorf cargados con las muestras y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el

tiempo, se añadió a los tubos 250µl del reactivo TBA Reagent, se cerraron y se incubaron a 95°C durante 45-60 minutos en un baño Selecta, Unitronis OR. El siguiente paso fue retirar los tubos del baño y enfriarlos con hielo durante 5 minutos para llevar a temperatura ambiente. Tras esto, fueron centrifugados a 3000 rpm 5 minutos y se les extrajo el sobrenadante para ser analizado. Por último, se pasaron 200µl del sobrenadante de cada tubo Eppendorf a una placa de multipocillos y se leyó a una absorbancia de 532nm en un lector de placa iMark microplate, Bio-Rad.

Para preparar la curva estándar, se hicieron una serie de diluciones de MDA en agua destilada en un rango de concentraciones de 125 µM a 0 µM.

### **3.14. Extracción de ARN.**

Tanto las células como los tejidos fueron lavados con PBS para después añadir 1ml TRIsure (TRIsure, Bioline). La mezcla con el reactivo de TRIsure se dejó incubar durante 5 minutos a una temperatura de entre 15°C y 25°C para provocar la disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación se retiró el TRIsure, se añadió Cloroformo (0,2ml/ml TRIsure) y se agitó durante 15 segundos, para después dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 15 minutos a 12000g y 4°C. Tras la centrifugación, la muestra quedó dividida en tres fases: una fase superior transparente (que contenía el ARN), una fase intermedia (que contenía el ADN) y una fase inferior de color verde (en la que se encontraban las proteínas). La fase superior se transfirió a un tubo limpio, se añadió Isoropropanol (0,5ml/ml TRIsure) y se mezcló por inversión. A continuación incubamos 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a 12000g, 10 minutos a 4°C y eliminamos el líquido sobrenadante. El ARN precipitado se lavó con EtOH 75% (1ml/ml TRIsure) y se volvió a centrifugar a 7500g, 5 minutos a 4°C. A continuación se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pella para posteriormente resuspenderla en 50µl

de H<sub>2</sub>O DEPC e incubarla 15 minutos a 60°C. El ARN ya purificado fue cuantificado mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000, de NanoDrop).

### **3.15. Tratamiento con DNAsa.**

Una vez extraído el ARN, este es tratado con el kit Deoxiribonucleasa I, Amplification Grade (Sigma), de acuerdo a las instrucciones que especifica su protocolo, un microgramo de RNA total de cada muestra se incubó en tampón de lavado gDNA a 42°C durante 5 min. Mediante este protocolo eliminamos la actividad RNAsa y los posibles restos existentes de ADN para obtener así un ARN útil para ensayos tan sensibles como lo es la Real Time PCR.

### **3.16. PCR en tiempo real.**

A partir del ARN sintetizamos cDNA usando el kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler de Bio-Rad, empleando 0,5µg de ARN por cada reacción y siguiendo el siguiente protocolo: 5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C.

La PCR en tiempo real consiste en un tipo de PCR cuantitativa que mide la cantidad de cDNA o de mRNA en una muestra, y se utiliza comúnmente para determinar la expresión de un gen, número de copias de mRNA. Para ello, existen varios métodos, pero todos basados en el uso de fluorocromos que emiten una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que se está sintetizando. Ambos procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, permitiendo conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. El sistema de detección por fluorescencia que empleamos en nuestros ensayos para la determinación de la expresión génica por PCR en tiempo real fue el sistema de detección por agentes intercalantes, concretamente el SYBR Green. Para ello hemos usado el kit comercial iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), de

acuerdo al protocolo descrito en el mismo y usando un volumen final de 25µl con 2µl de cDNA (obtenido a partir de 0,5µg de ARN). El SYBR Green es un fluorocromo que aumenta considerablemente la emisión de fluorescencia cuando se une a ADN, reflejando el incremento de ADN en cada ciclo en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

Para mejorar la especificidad de este fluorocromo iniciamos la reacción de síntesis de ADN a altas temperaturas (hot-start PCR), disminuyendo así el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Además, empleamos condiciones de reacción óptimas así como una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Para ello, los cebadores para PCR a tiempo real fueron diseñados con el programa informático Beacon Designer (Beacon Designer 4.01, Premier Biosoft Internacional). La reacción fue llevada a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad) que incorpora un lector de fluorescencia (MyiQ™ Single Color, Real Time PCR, Detection System, Bio-Rad). Los cebadores usados para NLRP3 fueron: 5'-GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA-3' (forward) y 5'-GCTGTCTTCCTGGCATATCACA-3' (reverse). Los de caspasa -1 fueron: 5'-CCGAAGGTGATCATCATCCA-3' (forward) y 5'-ATAGCATCATCCTCAAACCTTTCTG-3' (reverse). Los cebadores para IL-1β fueron: 5'-TTACAGTGGCAATGAGGATGAC-3' (forward) y 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3' (reverse). Se utilizó un segundo par de beta-actina cebadores como un control interno: forward: 5'-CCA GAT CATGTT TGA GAC C-3' y reverse: 5'-ATG TCA CGC ACG TCA TCCC-3'. Todas las reacciones se realizaron por duplicado. Las mezclas de reacción, sin ARN, se utilizaron como controles negativos en cada serie. La ausencia de contaminación de ADN genómico se confirmó mediante el establecimiento de las reacciones de control que no contienen transcriptasa inversa.

### **3.17. Determinación de los niveles de serotonina.**



Para la determinación de los niveles de Serotonina presentes células mononucleares de sangre periférica se usó un Kit de ELISA (GenWay, San Diego, CA, USA), procediendo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras una previa acetilación de las muestras, 25 µl de éstas se trasladaron a una placa multipocillos que tenía previamente unida el antígeno en la fase sólida de la misma. A partir de aquí las muestras fueron incubadas sucesivamente con un anticuerpo específico para la Serotonina, con un anticuerpo IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, y finalmente con el sustrato TMB. Después de detener la reacción, se midió a una absorbancia de 450 nm. La cuantificación de las muestras desconocidas se logró mediante la comparación de su absorbancia con una curva de referencia preparada con concentraciones estándar.

### **3.18. Inmunohistoquímica y análisis histológico.**

Para la inmunohistoquímica (IHQ), los ratones de cada grupo experimental fueron anestesiados y perfundidos con solución salina. Posteriormente, se extrajeron sus cerebros y se fijaron por inmersión durante 24 horas a 4 °C en paraformaldehído al 4% preparado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de esto, los tejidos fueron crioprotectados en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 2 días a 4 °C. Seguidamente, se cortaron los cerebros en secciones coronales (50 µm) y se procesaron por IHC de libre flotación para detectar Iba1 (1: 1000, Wako química EE.UU) y células doblecortina (DCX, 1: 500 [sc-8066] Santa Cruz de Biotecnología). La tinción de anticuerpos para IHC se visualizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diaminobencidina. Para minimizar la variabilidad, se analizaron al menos 2 secciones de hipocampo rostral (de -1,58 a -2,06 mm con respecto a bregma) o corteza prefrontal (1,94 a 1,70 mm con respecto al bregma) por ratón (n = 4 ratones por grupo) bajo un microscopio de campo claro DMRB RFY HC (Leica). Para las células de DCX, en cada sección se cuantificó el número total de células positivas en todo el giro dentado usando el software Image-J (descargado como un

paquete de software libre del dominio público: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Para determinar la activación de la microglía, se utilizó la aplicación contador de células de ImageJ y la densidad de células positivas Iba1 ramificadas, polarizadas e hipertrofiadas se contó en 6 imágenes (40 aumentos) de cada hipocampo y PFC.

Para llevar a cabo esta técnica, seguimos el protocolo para cortes flotantes en agitación (modificado de Martínez y Belmonte, 1996) que paso a describir a continuación:

En primer lugar se lavó el anticongelante, realizando 3 lavados de 4 minutos cada uno en PBS. Seguidamente se permeabilizó el tejido lavando el mismo 3 veces durante 8 minutos en PBS 0,5% Tritón X-100 (AppliChem). El siguiente paso fue efectuar 2 lavados de 8 min en PBS, para retirar el detergente. Para la inactivación de la actividad peroxidasa endógena, se incubó en una solución de 25% Agua destilada, 25% PB2x, 50% etanol y 1,66% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 min. Tras esto, se realizaron 2 lavados de PBS de 10 minutos. Y acto seguido, se equilibró el tejido mediante 2 lavados de 10 min en PBS 0,5% Tritón X-100. Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se incubó durante 1h con una solución de bloqueo (10% gelatina y 10% suero fetal bovino (PAA Laboratorios GMBH)) en PBS 0,5% Tritón X-100. Después se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada en una solución 10% gelatina y 3% suero fetal bovino en PBS 0,5% Tritón X-100) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego durante 12h a 4°C. Se incubó 30 minutos más a temperatura ambiente, y se lavó el exceso de anticuerpo primario con 4 lavados de 10 minutos en PBS 0,5% Tritón X-100. La incubación con el respectivo anticuerpo secundario acoplado a biotina se realizó durante 1h a temperatura ambiente diluyendo éste en 10% gelatina, 3% suero fetal bovino en PBS 0,5% Tritón X-100. Tras esto, se lavó el exceso de anticuerpo secundario realizando 3 lavados de 8 minutos en PBS 0,5% Tritón X-100, y se lavó el detergente haciendo 3 lavados de 5 minutos en PBS. Para amplificar la reacción se incubó con una solución

avidina-estreptavidina-peroxidasa (kit comercial ABC, Vector Laboratories Inc.) durante 1h. La solución consistió en una proporción 3:3 ( $\mu$ l) de los reactivos A y B por mililitro de PBS, la cual debe ser preparada al menos 20 min antes de su utilización para permitir la formación de los complejos. Después de esto, se lavó el exceso efectuando 3 lavados de 8 minutos en PBS 0,5% Tritón X-100 y a continuación, se lavó el detergente mediante 3 lavados de 5 minutos en PBS. Finalmente se reveló en primer lugar doblecortina empleando diaminobencidina y níquel (DAB-Níquel), con una solución de revelado de 16,6 $\mu$ l DAB (30mg/ml) y 0,3 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mililitro de PBS, más 0,1 de sulfato de níquel (DAB, Sigma-Aldrich). Una vez parada la reacción se puso el anticuerpo secundario específico para iba1 que se reveló solo con DAB. Se incubó el tiempo necesario para ver la señal con la solución de revelado y se paró la reacción retirando el exceso de la misma mediante lavados con PBS (5-6 lavados). El siguiente paso fue montar los cortes en portaobjetos empleando solución de montaje y dejamos secar al menos 24h. Se sumergieron los portaobjetos en xilol durante 5 minutos, se cubrieron con DPX y cubreobjetos, se dejó secar varios días y se limpiaron las preparaciones retirando el exceso de DPX con una cuchilla y alcohol al 70 %.

### **3.19. Análisis Estadístico.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete SPSS para Windows (SPSS, Chicago, IL). A menos que se indique lo contrario, los datos representan la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico de las diferencias observadas entre los parámetros numéricos de todos los grupos se realizó mediante un ANOVA de un solo sentido usando un todo procedimiento de comparación múltiple por parejas (Prueba de Tukey) para la corrección. El nivel de significación se fijó en  $P < 0,05$ . Los análisis estadísticos incluyeron las correlaciones de Pearson entre IL-1b e IL-18 respecto al BDI. Las correlaciones parciales para controlar el efecto antidepresivo factor de confusión también se realizaron. En los

ratones, todos los datos fueron analizados estadísticamente con un análisis multivarianza (ANOVA) seguido a continuación de t-student para evaluar diferencias entre todos los pares de grupos posibles.

# RESULTADOS



#### 4. RESULTADOS

Para intentar demostrar la implicación del complejo NLRP3-Inflamasoma en la fisiopatología de la depresión mayor hemos hecho un estudio que consta de tres partes.

##### ***PARTE 1: Activación del complejo NLRP3-inflamasoma en el TDM***

En la primera parte de nuestro estudio, se ha determinado el estado de activación del complejo NLRP3-inflamasoma en una muestra de 40 pacientes diagnosticados de TDM y 20 personas voluntarias sanas (grupo control). De estos 40 pacientes, un grupo de 20 pacientes estaba en tratamiento con el antidepresivo tricíclico amitriptilina (grupo amitriptilina), y otro grupo de 20 pacientes no estaba en tratamiento con amitriptilina (grupo TDM). Como se muestra en la **Tabla 1**, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según la edad y el sexo. Para evaluar el grado de depresión de los individuos de los tres grupos se evaluaron con el inventario de depresión de Beck (BDI), mostrando el grupo TDM una puntuación significativamente mayor ( $40,9 \pm 5,9$ ) comparada con la del grupo tratado con amitriptilina ( $8,2 \pm 4,6$ ) y con el grupo control ( $3,4 \pm 3,8$ ) ( $P < 0,001$ ).

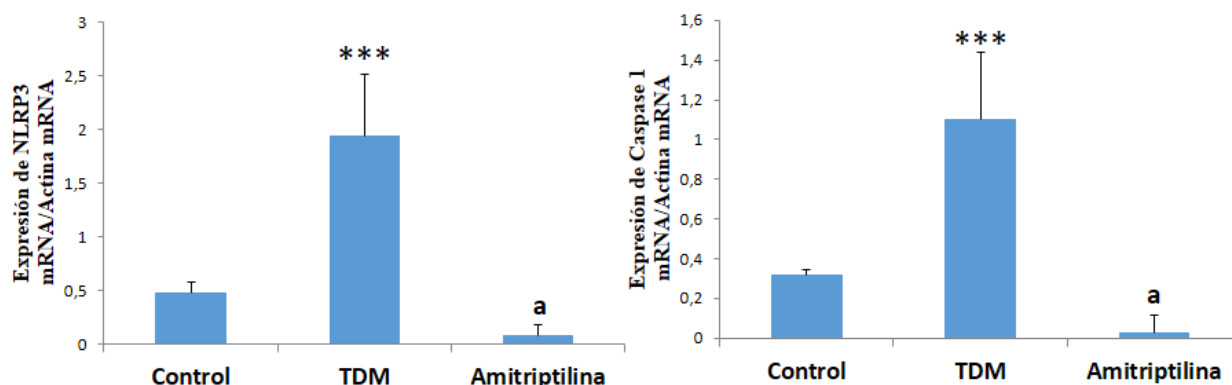
**Tabla 1.** La edad, el sexo, la dosis y el tiempo de tratamiento en el momento de la punción venosa para el aislamiento de la sangre periférica.

	Control	TDM	Amitriptilina
Nº Pacientes	20	20	20
Edad (años)	57± 3	54.4± 10.1	53.5±9.8
Sexo (mujer/hombre)	18/2	18/2	19/1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.6 ± 5.1	23.3 ± 3.2	22.9 ± 3.9
Dosis (mg/d)	---	---	62.5 ± 12
Meses en tratamiento	---	---	12.1±2.3
BDI	3.4 ± 3.8	40.9 ± 5.9	8.2 ± 4.6

#### 4.1. El complejo NLRP3 inflammasoma se activa en PBMC de pacientes con TDM.

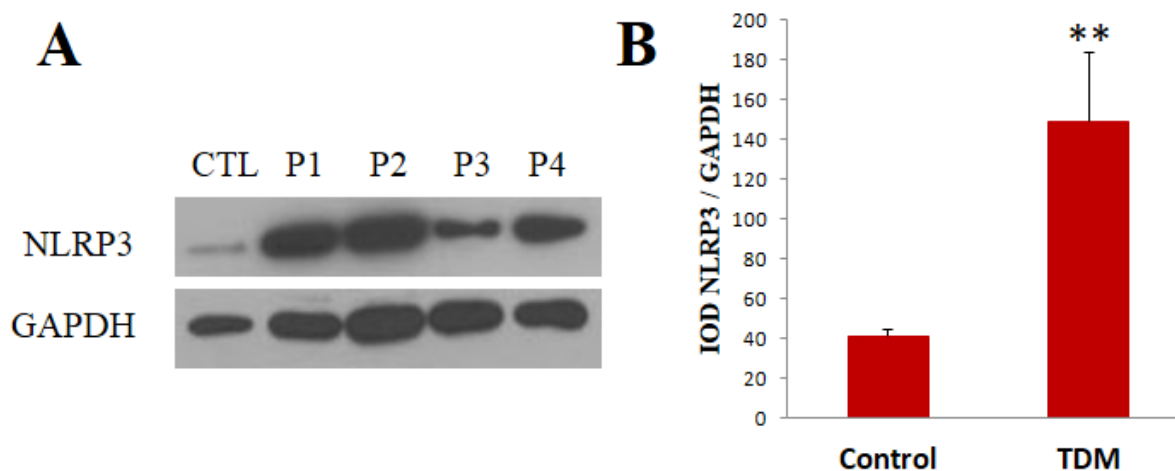
Para determinar si el complejo NLRP3 se encontraba activado en los pacientes analizados, se analizó mediante RT-PCR la expresión de los genes de NLRP3 y caspasa-1, que son los genes responsables de la activación del inflammasoma, en PBMCs de los pacientes. Los resultados han mostrado un aumento de la expresión de los genes NLRP3 ( $P < 0,01$ ) y caspasa-1 ( $P < 0,01$ ) en los pacientes con TDM respecto al grupo de control y al grupo de amitriptilina, lo que sugiere una activación del inflammasoma (Figura 1A y B).





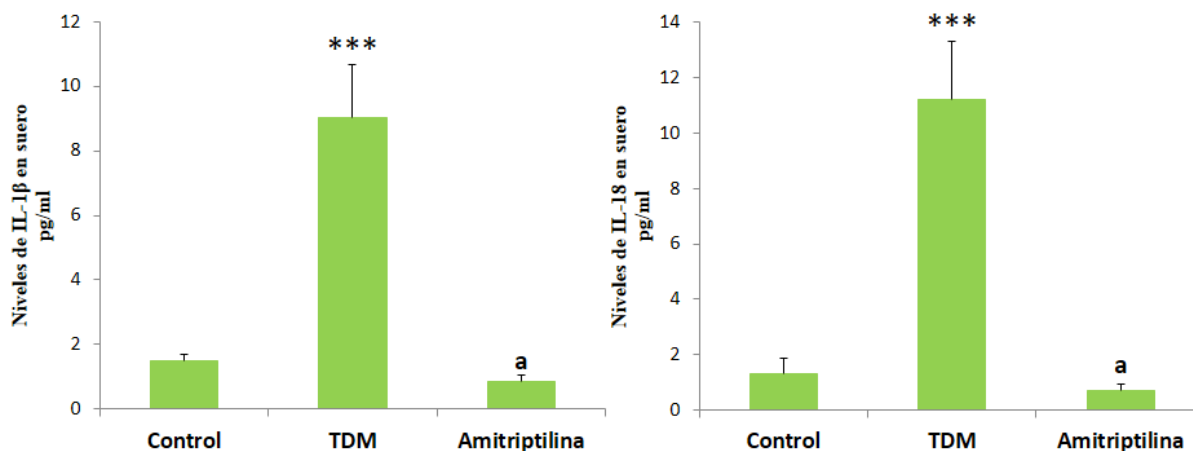
**Figura 1. Activación del NLRP3-inflamasoma en PBMC de pacientes con TDM.** A-B. Los niveles de expresión de los transcritos de NLRP3 y caspasa-1 en relación a los de  $\beta$ -actina se determinaron por PCR cuantitativa en tiempo real RT-PCR como se describe en Material y Métodos;  $n = 20$  para el grupo control,  $n = 20$  para el grupo TDM y  $n = 20$  para el grupo TDM tratado con amitriptilina. \*\*\* $P < 0,001$  entre los controles y los pacientes con TDM; <sup>a</sup> $P < 0,001$  entre TDM y pacientes tratados con Amitriptilina. Los datos representan la media  $\pm$  desviación típica (SD) de tres experimentos independientes.

Por otra parte, determinamos por Western-blot la expresión de la proteína NLRP3 en las PBMCs de pacientes con TDM e individuos sanos. Nuestros resultados mostraron un importante incremento de la proteína NLRP3 en estos pacientes con TDM (**Figura 2A y B**).



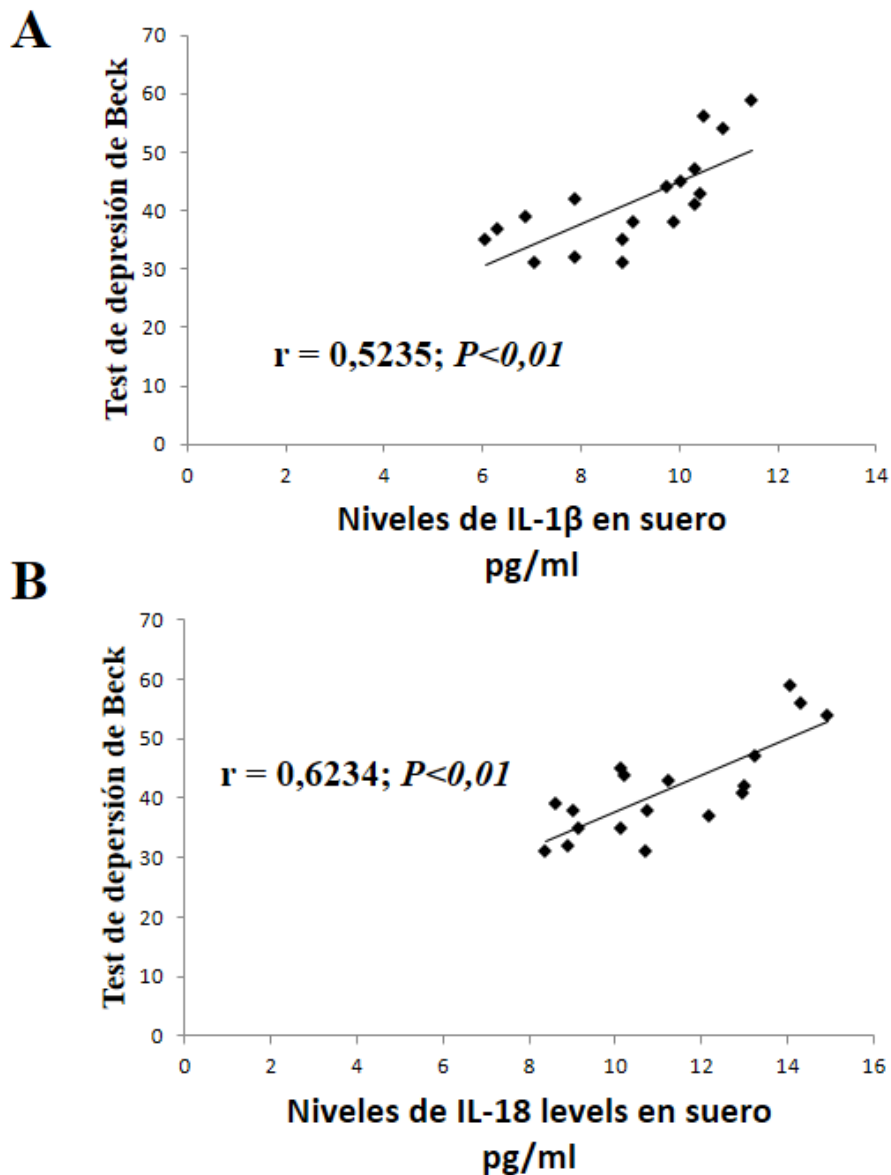
**Figura 2. Activación NLRP3-inflamasoma en las PBMC de pacientes con TDM.** **A.** Los niveles de proteína NLRP3 se analizaron por Western blot usando PBMC de cuatro pacientes representativos, en comparación con un grupo de 3 sujetos control sanos emparejados en edad y sexo con los pacientes (Control). **B.** Media de la expresión de proteínas de todos los pacientes. Los niveles de expresión de proteínas fueron cuantificados por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres diferentes Western blot y normalizado con la señal de GAPDH.  $**P < 0,01$  entre los controles y los pacientes con TDM. Los datos representan la media  $\pm$  desviación típica (SD) de tres experimentos separados.

Además, analizamos por ELISA otras proteínas derivadas de la activación del inflammasoma y relacionadas con la inflamación, IL-1 $\beta$  e IL-18 en el suero de individuos de los tres grupos de pacientes. Nuestros ensayos mostraron un incremento de ambas interleuquinas en los sueros de pacientes con TDM con respecto a los grupos control y amitriptilina (**Figura 3A y B**).



**Figura 3. Citoquinas inflamatorias en el suero de pacientes con TDM. A-B.** Los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-18 respectivamente en suero de controles, TDM no tratados y TDM tratados se determinaron por ELISA como se describe en Material y métodos.  $n = 20$  para el control,  $n = 20$  para el TDM no tratados y  $n = 20$  para el grupo de TDM tratado con amitriptilina. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0,001$  entre el grupo control y el TDM no tratado, <sup>a</sup> $P < 0,001$  entre el TDM no tratados y el grupo de TDM de pacientes tratados con amitriptilina.

Por otro lado, quisimos conocer si había alguna relación entre los niveles de depresión y los niveles séricos de estas citoquinas. Los resultados han revelado una alta correlación positiva entre los niveles de la IL- $\beta$  e IL-18 y las puntuaciones obtenidas en el BDI por los pacientes (**Figura 4A y B**). Estos datos sugieren que los altos niveles de la IL-1 $\beta$  y de IL-18 pueden tener un papel en la fisiopatología del TDM. Sin embargo, no se observó una correlación significativa entre las puntuaciones del BDI y los niveles de expresión génica de NLRP3 o caspasa-1, lo que podría ser debido al reducido tamaño de la muestra.

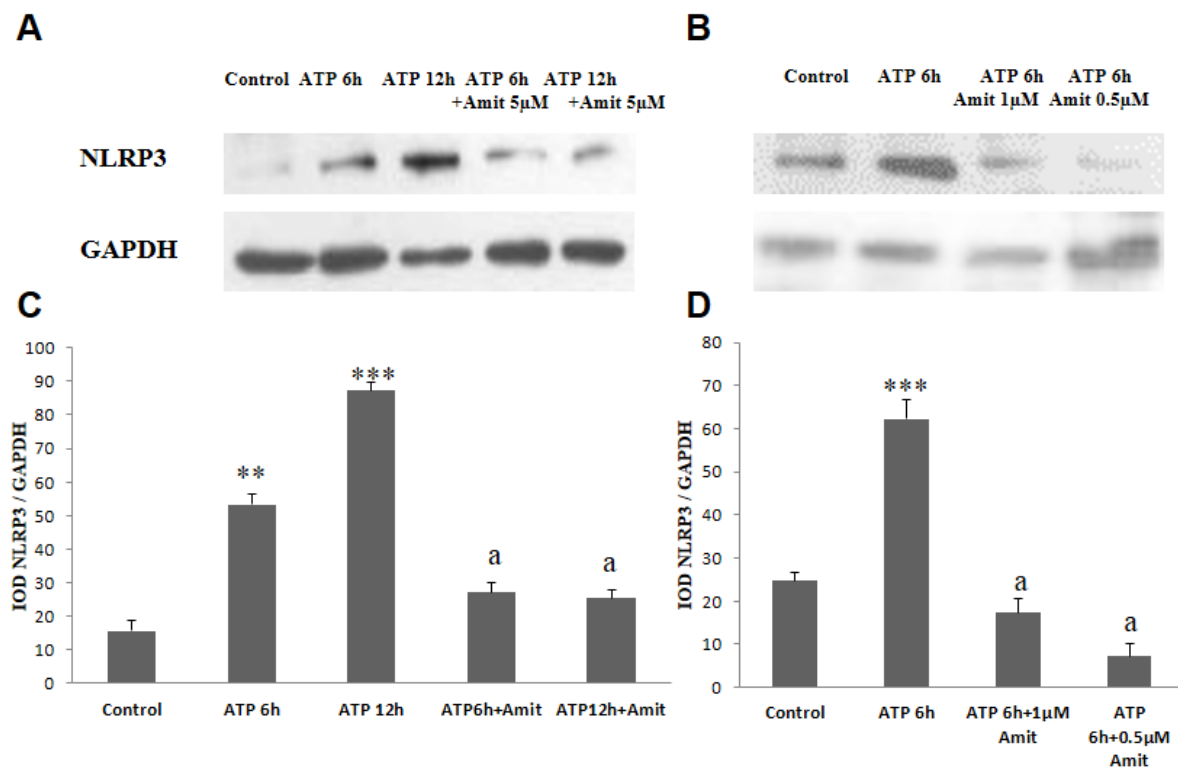


**Figura 4.** Efecto de las citoquinas inflamatorias en el síntoma depresivo de pacientes con TDM. **A y B.** Correlación de los niveles de la IL-1 $\beta$  (A), y la IL-18 (B) en el suero de pacientes con TDM con las puntuaciones del Inventario de Depresión de Beck. La asociación fue establecida mediante el cálculo de los coeficientes de correlación.

#### 4.2. La amitriptilina reduce la activación del inflamasoma NLRP3 en los pacientes con TDM.

Como ya se ha comentado anteriormente, algunos estudios demuestran que los antidepresivos ATC y los ISRS normalizan los niveles séricos de citoquinas inflamatorias en los pacientes deprimidos, así como que aumentan la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Hannestad et al., 2011; Iwata et al., 2013). Anteriormente, hemos mostrado que los pacientes tratados con amitriptilina mostraron una disminución de la expresión de los genes NLRP3 y caspasa-1 en comparación a los sujetos controles no tratados (**Figura 1A-B**), y que los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-18 en suero se redujeron significativamente después del tratamiento, en comparación a los controles (**Figura 3A-B**). Para determinar la fuerza de la asociación de las puntuaciones del BDI con los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-18 en suero de los pacientes tratados con amitriptilina se realizó un análisis de correlación parcial. Esta asociación se redujo después de controlar tales efectos ( $r = 0,275$ ;  $P < 0,21$  para la IL-1 $\beta$  y  $r = 0,309$   $P < 0,18$  para la IL-18).

Para comprobar el efecto de la amitriptilina en la activación de NLRP3, se hizo un experimento in vitro, utilizando un modelo in vitro de activación del inflamasoma usando células THP-1 (monocitos humanos inmortalizados), a las que se provocó la activación del inflamasoma mediante tratamiento con ATP 5 mM (uno de los mayores inductores del inflamasoma documentados), en presencia o ausencia de amitriptilina (0,5, 1 y 5  $\mu$ m). A continuación, los niveles de expresión de NLRP3 fueron evaluados por Western- blot. Los resultados mostraron que el tratamiento con la amitriptilina previno el aumento de los niveles de expresión de la proteína NLRP3 inducida por el ATP en las células THP-1 (**Figura 5A a D**).

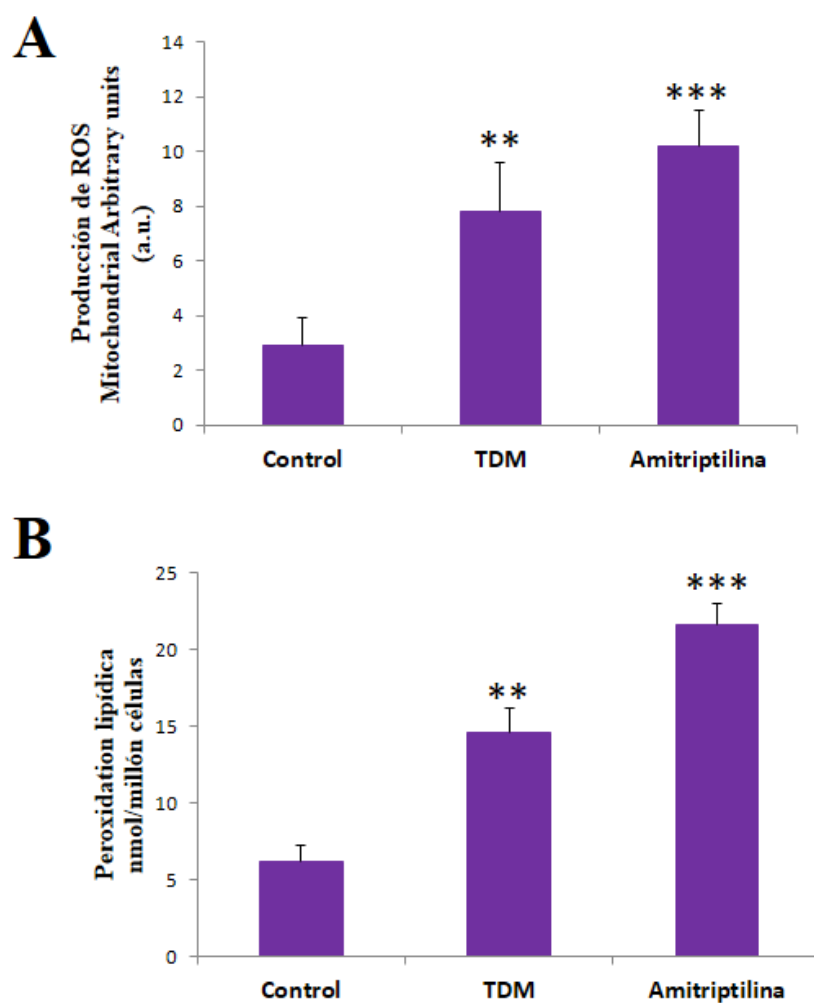


**Figura 5. Efecto de la amitriptilina sobre la expresión de NLRP3 inducida por ATP.** A y B. Los niveles de expresión de la proteína NLRP3 se determinaron en las células THP-1 después de 6 h y 12 h de tratamiento con ATP 5 mM en presencia o ausencia de Amitriptilina (Amit) 5, 1 y 0,5 μM por Western blot. C y D. Los niveles de proteínas fueron cuantificados por análisis densitométrico (IOD, intensidad integrada óptica) de tres diferentes Western blot de tres experimentos independientes y se normalizaron a la señal de GAPDH. \*\*\* $P < 0,001$  y \*\* $P < 0,01$  entre el grupo control y los pacientes con depresión.

#### 4.3. El estrés oxidativo en PBMC de pacientes con TDM.

Como hemos mencionado antes, el estrés oxidativo constituye un importante elemento en la fisiopatología del TDM. Además, se ha mostrado que existe una clara disfunción mitocondrial en estos pacientes por lo que no es de extrañar que el estrés oxidativo originado en la mitocondria esté presente en el TDM. Por otro lado, recientemente se ha

mostrado como el estrés oxidativo mitocondrial induce la activación de NLPR3-inflamasoma (Zhou et al., 2011; Shimada et al., 2014). Por ello, para comprobar si existen altos niveles de estrés oxidativo mitocondrial en el TDM y su implicación en la activación observada del complejo inflamasoma, hemos evaluado los niveles de producción mitocondrial de ROS y LPO en las PBMC de los tres grupos de sujetos. En primer lugar, los niveles de ROS se midieron utilizando MitoSOX, un indicador de superóxido mitocondrial. Los resultados mostraron que la producción mitocondrial de superóxido fue significativamente mayor en PBMC del grupo TDM y amitriptilina con respecto al grupo control ( $P<0,001$ ) (**Figura 6A**). En segundo lugar, se midieron los niveles de LPO, como marcador del daño a los lípidos de la membrana inducido por el estrés oxidativo de origen mitocondrial. Los resultados mostraron niveles de LPO significativamente mayores en las PBMC del grupo TDM y amitriptilina al compararlo con los niveles del grupo control (**Figura 6B**).



**Figura 6. Producción de ROS mitocondriales y niveles de peroxidación lipídica en pacientes con TDM. A- B.** ROS y la peroxidación lipídica de los grupos control, TDM y TDM tratados con amitriptilina. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*\*P < 0,01 entre el control y los pacientes con TDM, \*\*\*p < 0,005 entre control y los pacientes tratados con amitriptilina.

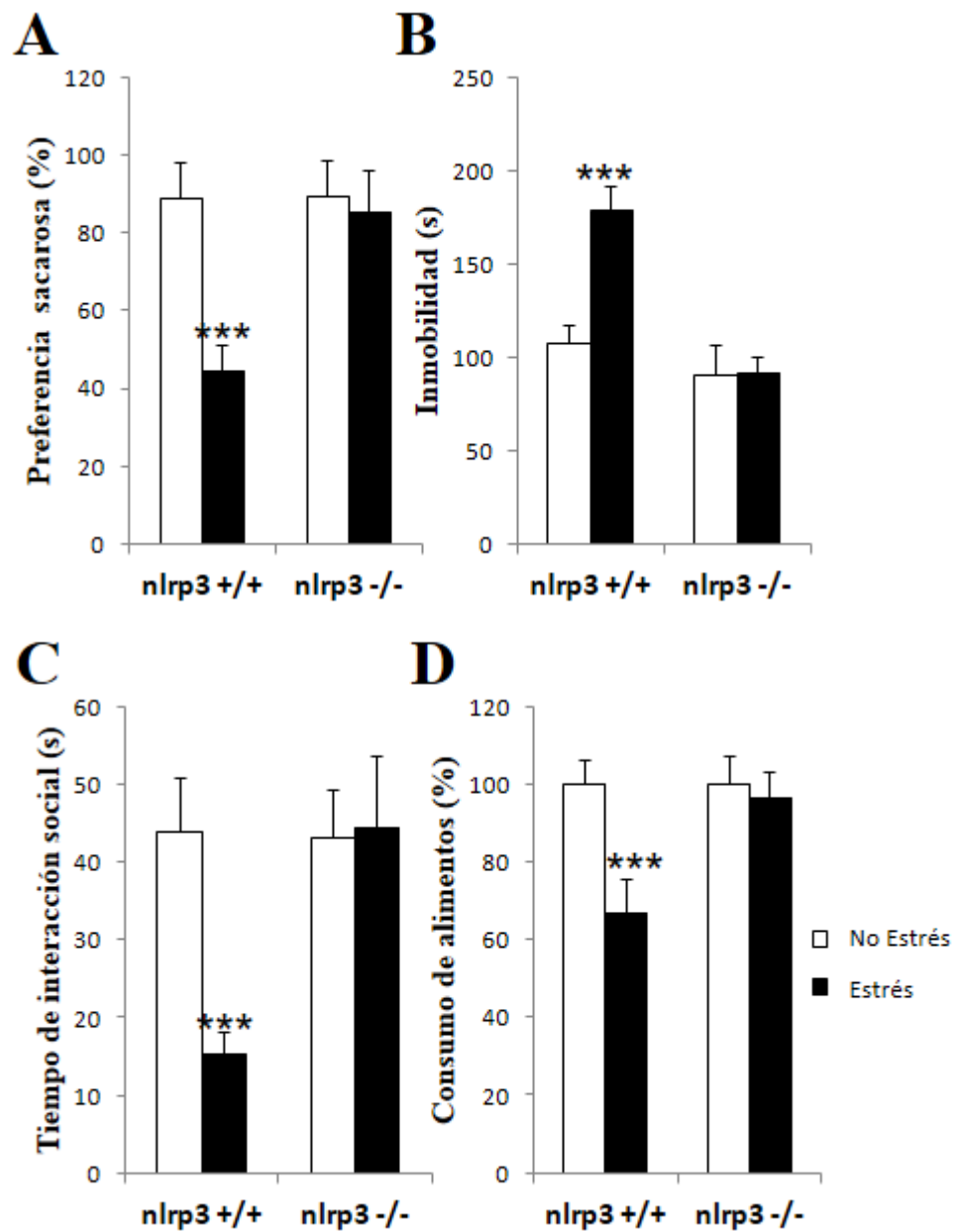


## ***PARTE 2: Implicación del complejo inflammasoma en la depresión inducida por estrés***

Numerosos estudios han demostrado que la exposición al estrés incontrolable es uno de los factores que más contribuyen al desarrollo del TDM. En este sentido, para evaluar si el complejo NLRP3-Inflamasoma es necesario para el desarrollo de la depresión inducida por estrés, evaluamos los efectos del estrés crónico en ratones carentes del gen NLRP3 (grupo NLRP3  $-/-$ ) comparándolo con los efectos del estrés sobre ratones silvestres (grupo NLRP3  $+/+$ ). 10 ratones de cada genotipo fueron sometidos a estrés, Restraint stress (RS), durante 30 días consecutivos. Como grupo control el mismo número de ratones de cada genotipo fue establecido en ausencia de estrés. Pasado el período de RS, todos los animales se evaluaron en pruebas de preferencia por la sacarosa, ingesta de alimento, natación forzada e interacción social, pruebas usadas para medir el comportamiento depresivo en roedores.

### **4.4. La delección de NLRP3 protege del comportamiento depresivo inducido por estrés**

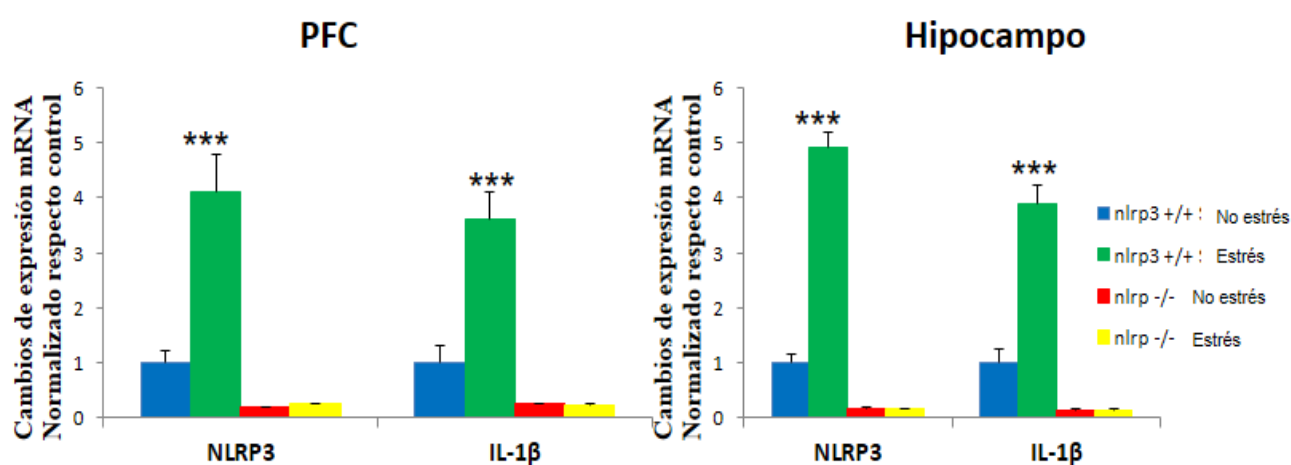
Los resultados muestran que el RS indujo comportamientos depresivos evidentes en el grupo  $nlrp3+/+$ : mostraron menos preferencia por la sacarosa ( $P < 0,01$ ), mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada ( $P < 0,001$ ), menos tiempo dedicado a la interacción con el congénere en la prueba de interacción social ( $P < 0,001$ ), y una reducción en la ingesta de alimentos (**Figura 7A-D**). Todas estas alteraciones conductuales no se observaron en los ratones NLRP3  $-/-$  (**Figura 7A-D**).



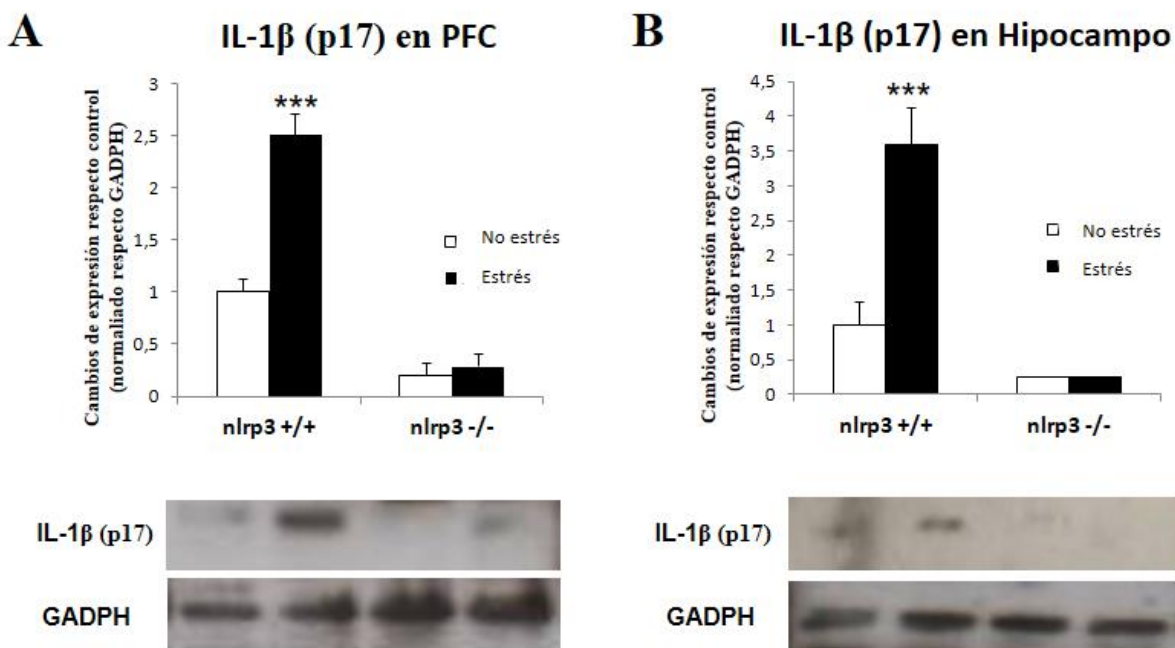
**Figura 7.** La delección o supresión del gen NLRP3 en los ratones previene de los comportamientos depresivos inducidos por RS. **A.** Prueba de la preferencia por la sacarosa. **B.** Tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada. **C.** Prueba de interacción social. **D.** Prueba de consumo de alimentos. Los resultados expresan la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $P < 0,001$  ( $N = 10$  para cada grupo).

#### 4.5. El RS induce la activación de NLRP3-inflamasoma en el córtex prefrontal e hipocampo

Por otra parte, analizamos la expresión de los genes NLRP3 e IL-1 $\beta$  en el córtex prefrontal (PFC) y el hipocampo de todos los animales, dos regiones cerebrales relacionadas con la depresión. Los resultados muestran que los ratones NLRP3  $+/+$  sometidos a RS incrementaron significativamente en la transcripción de NLRP3 e IL-1 $\beta$  en el PFC y el hipocampo ( $P < 0,001$ ; **Figura 8A y B**), así como un aumento de la maduración de IL-1 $\beta$  (**Figura 9A y B**). Por el contrario, en los ratones NLRP3  $-/-$  no se produce tal aumento en NLRP3 ni IL-1 $\beta$  después de haber sido expuestos a RS (**Figura 8 y 9A y B**) por la ausencia del gen NLRP3.

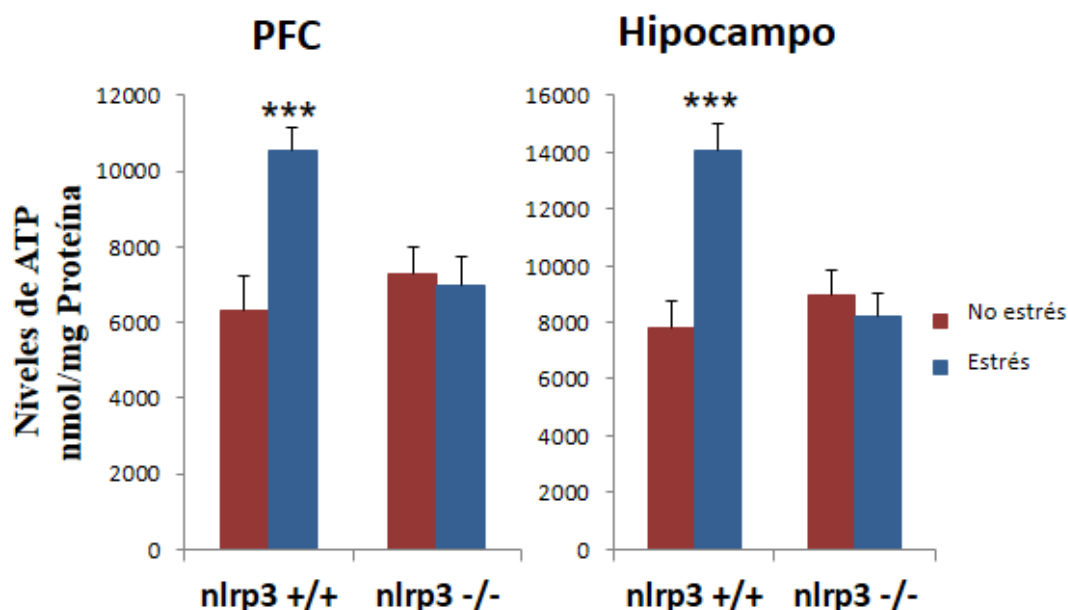


**Figura 8.** La delección o supresión de NLRP3 en ratones previene contra la activación del inflamasoma inducida por RS. **A.** Cuantificación de NLRP3 mRNA en cortex prefrontal (PFC) e hipocampo de ratones NLRP3  $+/+$  y NLRP3  $-/-$  sometidos o no a RS. **B.** Cuantificación de IL-1 $\beta$  en cortex prefrontal (PFC) e hipocampo de ratones NLRP3  $+/+$  y NLRP3  $-/-$  sometidos o no a RS. Los resultados expresan la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $P < 0,001$  ( $N = 10$  para cada grupo).



**Figura 9. La delección de NLRP3 en ratones previene contra la activación del inflammasoma inducida por RS.** **A.** Cuantificación de la proteína IL-1β (p17) en cortex prefrontal (PFC) de ratones NLRP3 +/+ y NLRP3 -/- sometidos o no a RS. **B.** Cuantificación de la proteína IL-1β (p17) en hipocampo de ratones NLRP3 +/+ y NLRP3 -/- sometidos o no a RS. Los resultados expresan la media  $\pm$  SD. \*\*\*  $P < 0,001$  (N = 10 para cada grupo).

El RS aumentó la cantidad de adenosina trifosfato o ATP en el PFC y el hipocampo (**Figura 10**). Dado que el incremento de ATP o la liberación de ATP al espacio extracelular por parte de la célula ha demostrado activar el complejo NLRP3-inflammasoma, estos datos nos muestran que probablemente, el RS induce la activación del inflammasoma mediante el incremento de los niveles de ATP.



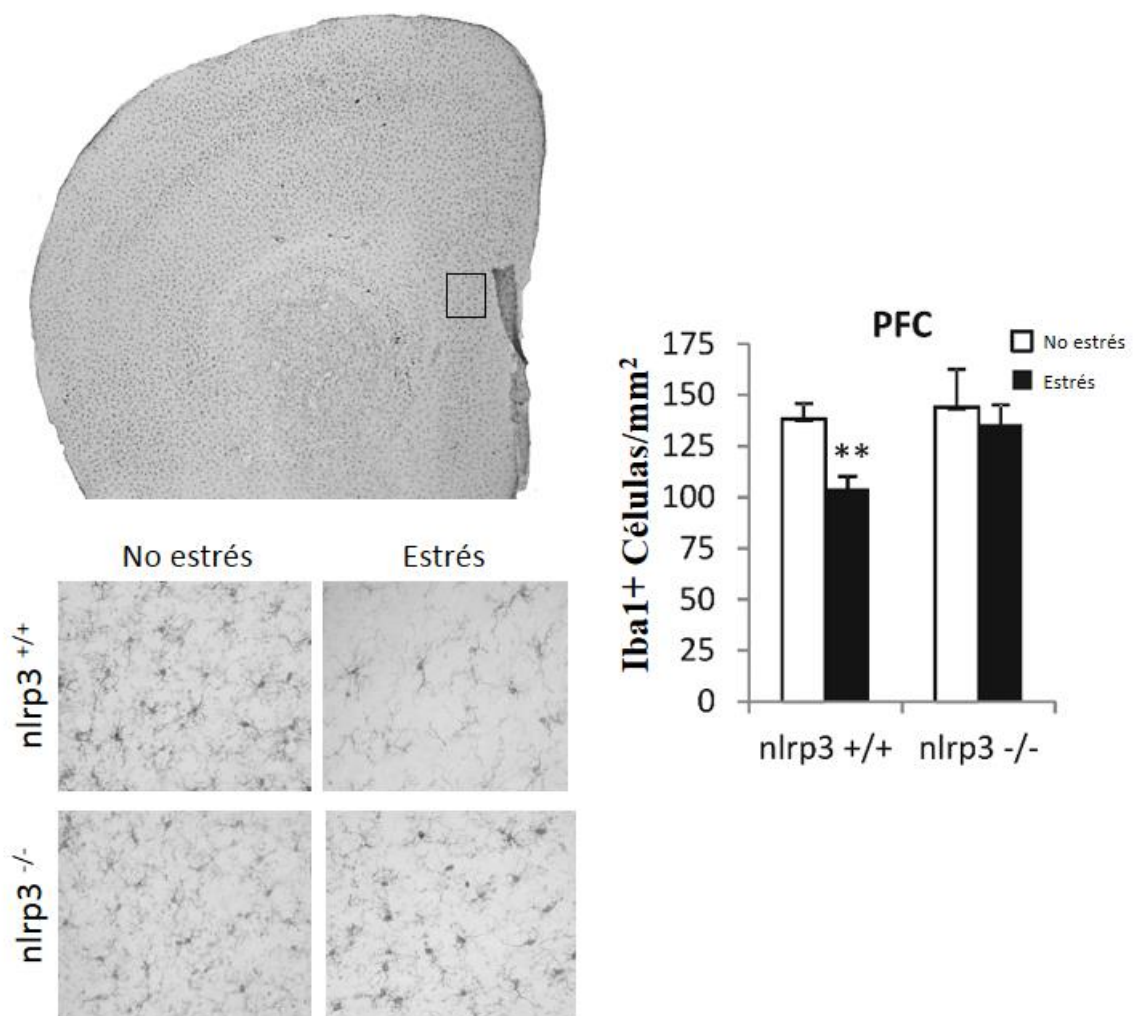
**Figura 10. El RS induce un aumento de ATP.** RS induce incrementos de los niveles de ATP en el hipocampo y PFC. Todos los resultados son mostrados como la media  $\pm$ SD. \*\*\*  $p < 0,001$  (N = 10 para cada grupo).

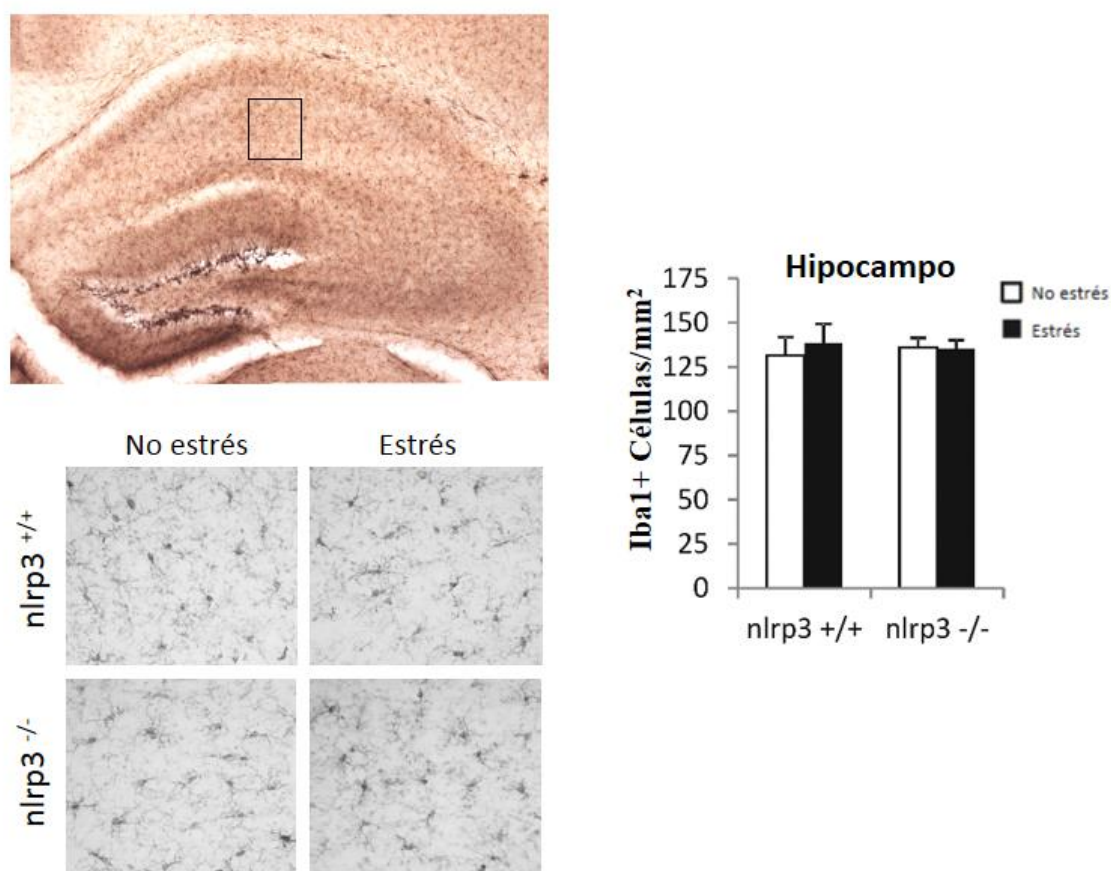
#### 4.6. La delección de NLRP3 previene de la activación de la microglía e inhibición de la neurogénesis inducida por RS

La microglía está implicada en el desarrollo de comportamientos depresivos y neuroinflamación (Kettenmann et al., 2011; Kreisel et al., 2014). Dado que hay estudios que describen que el complejo NLRP3-Inflamasoma se expresa en la microglía (Pan et al., 2014), quisimos analizar si el comportamiento depresivo inducido por RS estaba relacionado con la activación del inflamasoma de o en la microglía, o por el contrario era un fenómeno independiente de esta activación. Para esto hemos analizado la densidad de la población microglial mediante tinción contra Iba1, un marcador de las células microglias, y la morfología microglial, un indicador de su estado de

activación, en la PFC y en el hipocampo de los cuatro grupos de animales en estudio. Nuestros resultados revelaron que el RS crónico produjo una disminución de la densidad de células microgliales en la PFC de los ratones *nlrp3*<sup>+/+</sup> ( $138,33 \pm 7,51$  en los controles y  $104,44 \pm 5,71$  en los ratones sometidos a RS;  $t(8) = 3,66$ ,  $P=0,006$ : **Figura 11A**). Sin embargo, estos cambios no fueron observados en el hipocampo (**Figura 11B**).

**A**

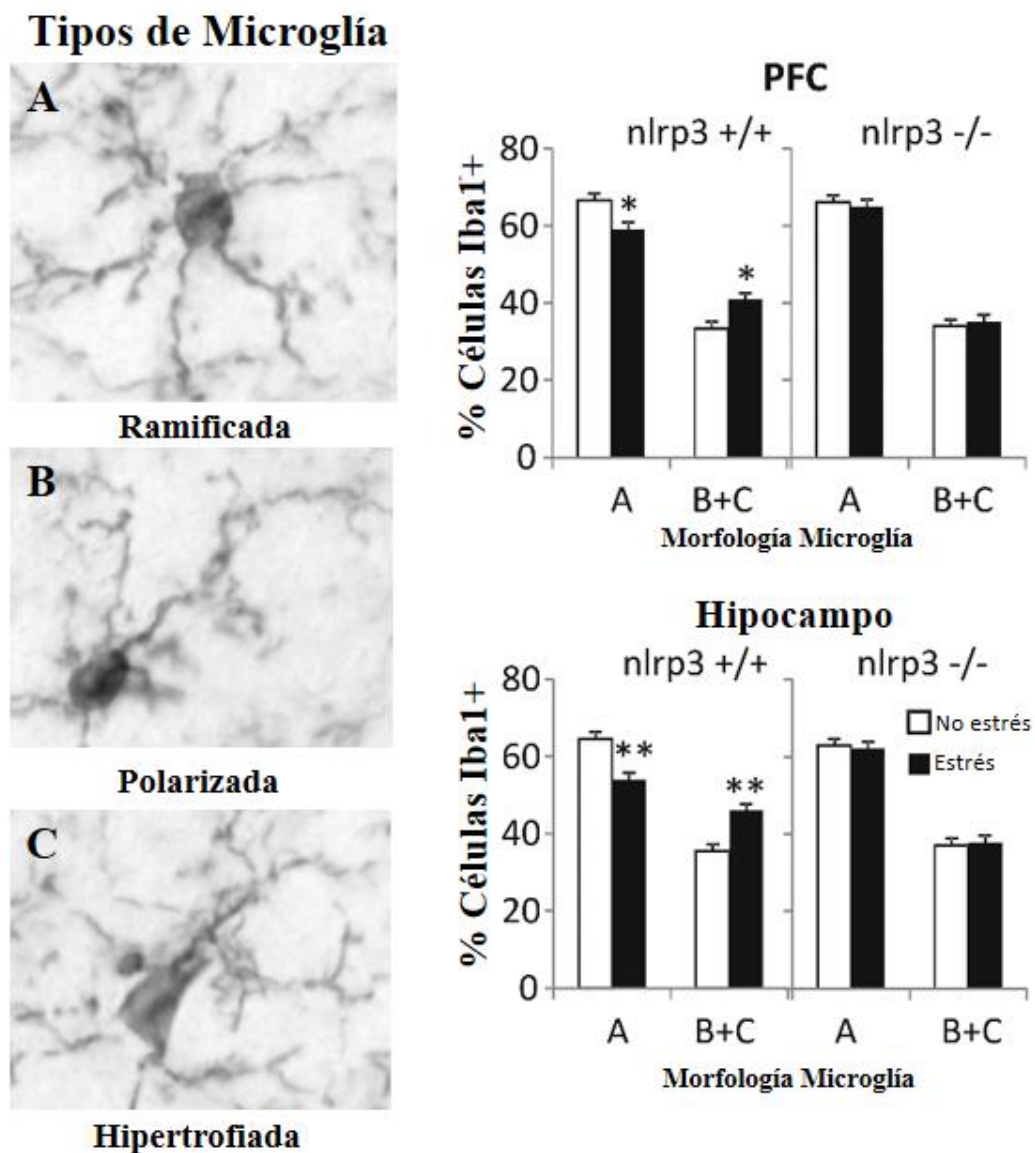


**B**

**Figura 11. La delección de NLRP3 en ratones impide la activación de la microglía inducida por el RS.** Las células microgliales y la neurogénesis fueron evaluados por inmuno-histoquímica contra Iba1 y DCX en el tejido cerebral de ratones NLRP3 +/+ y NLRP3 -/- sometidos a RS más de 30 días. **A. Imagen superior.** Representación micrográfica de PFC. **B. Imagen inferior.** Representación micrográfica de hipocampo. En ambos casos, el cuadro en las imágenes representa una ampliación del PFC y el hipocampo. En ambos casos, el cuadro en las imágenes representa una ampliación del PFC y el hipocampo, así como una región cuantificada. Las células inmaduras DCX + están en negro y la microglía está en gris. La densidad de células microgliales se cuantificó en el PFC y el hipocampo rostral. \*\*  $P < 0,01$  ( $N \geq 3$  para cada experimental grupo)

Además, el RS parece provocar la activación microglial, puesta de manifiesto como un aumento en el porcentaje de células Iba1 + polarizadas e hipertróficas en el PFC y en el

hipocampo de ratones NLRP3  $+/+$  ( $t(8) = 2,96$ ,  $P=0,018$  para el PFC y  $t(8) = 4,21$ ,  $P=0,002$  para el hipocampo; **Figura 12**). Curiosamente, todas estas alteraciones en los parámetros microgliales encontrados en el PFC y el hipocampo de ratones NLRP3  $+/+$  sometidos a RS no se observaron en ratones NLRP3 $-/-$  después de la misma manipulación.

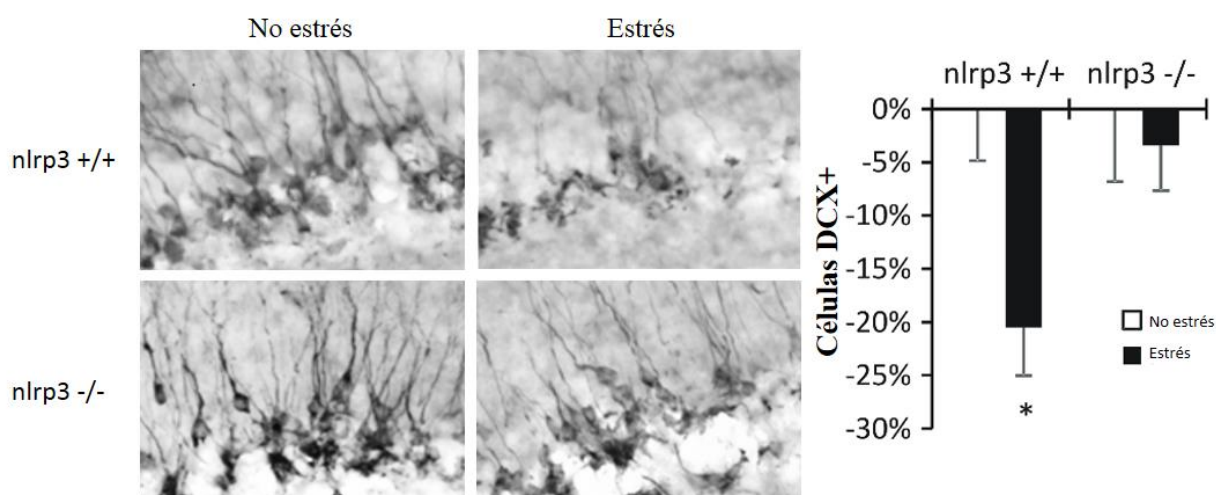


**Figura 12.** La delección de NLRP3 previene del aumento de la microglía activa. La activación microglial fue evaluado dependiendo de su morfología: las células polarizadas e hipertroficas son



consideradas como activas. Los porcentajes de cada célula microglial en cada grupo experimental se representa por la media: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , ( $N \geq 3$  para cada experimental grupo).

Como la activación de la microglía es un regulador negativo de la neurogénesis del hipocampo adulto (Ekdahl et al., 2003; Koo et al., 2008) y la neurogénesis del hipocampo adulto se ha asociado con comportamientos depresivos (Banar et al., 2011), en el sentido de que la depresión va acompañada de una disminución de la neurogénesis, en el presente trabajo hemos realizado un estudio del número de neuronas inmaduras DCX+ en el giro dentado del hipocampo como marcador de neurogénesis, en todos los grupos de animales. Los resultados han mostrado una disminución aproximadamente del 20% en el número de células DCX expresadas, en ratones NLRP3 + / + sometidos a RS ( $t(8) = 3,06$ ,  $P = 0.015$ : **Figura 13**), indicando esto una disminución de la neurogénesis en estos ratones. Esta disminución no se observó sin embargo, en los ratones que carecen de NLRP3 (NLRP3-/-).

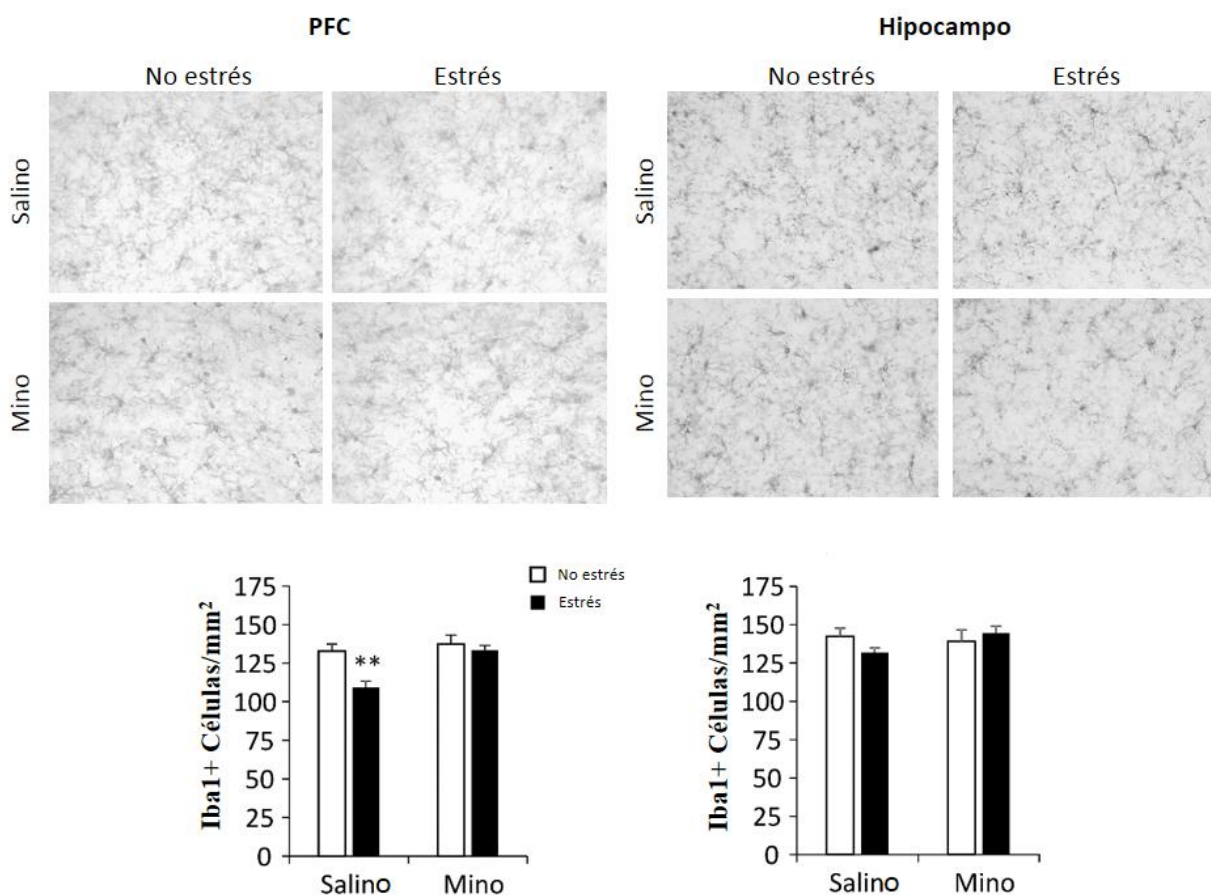


**Figura 13. La eliminación genética de NLRP3 protege del deterioro en la neurogénesis inducido por RS.** La neurogénesis adulta en el hipocampo se evaluó a través de la DCX + células en el giro dentado.

Los cambios en la densidad celular DCX +con respecto al grupo control: \*  $P < 0,05$  ( $N \geq 3$  para cada uno de los grupos experimentales).

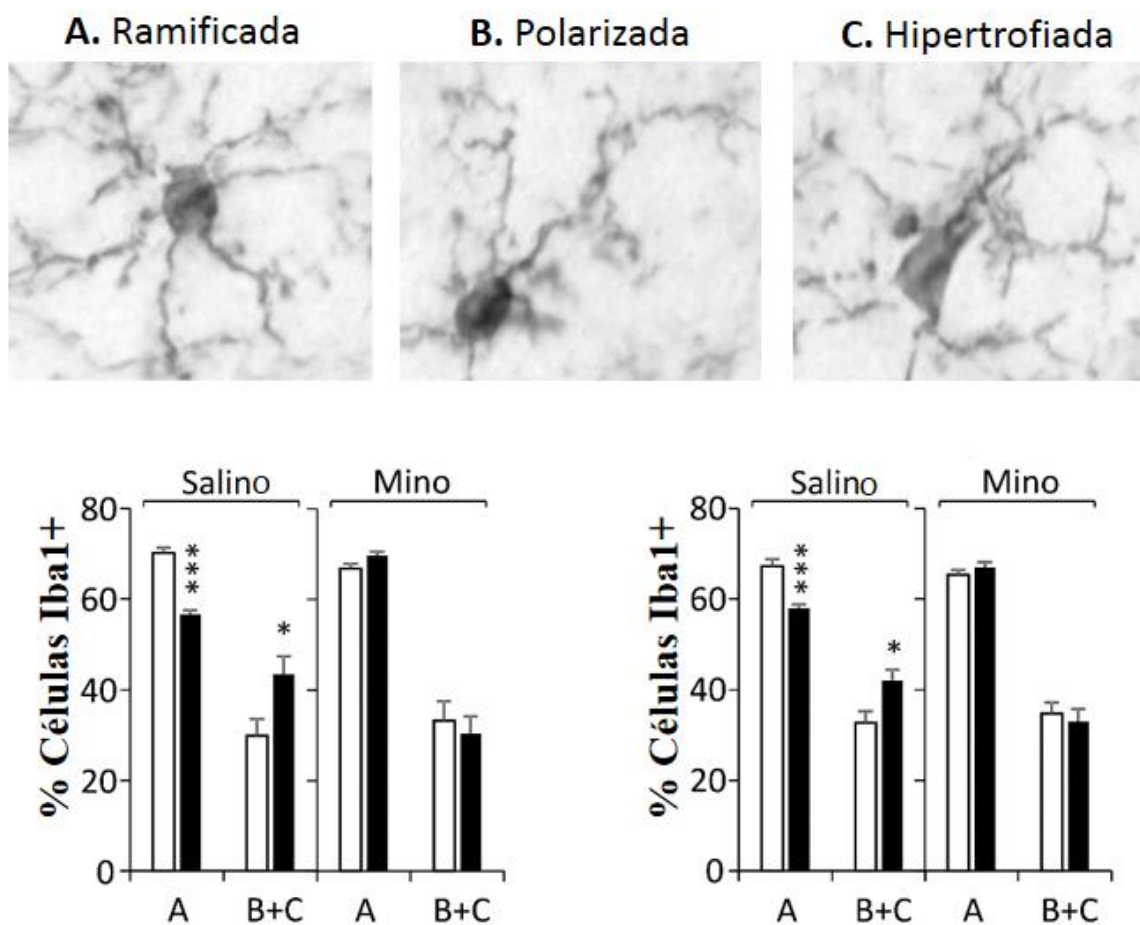
#### **4.7. La inhibición de la microglía previene del comportamiento depresivo y activación del inflamasoma inducidos por RS**

Finalmente, para valorar el rol de la microglía en la activación del inflamasoma y en el desarrollo de la depresión inducida por estrés, realizamos un último experimento en el que se inhibió farmacológicamente la respuesta neuroinflamatoria de la microglía, mediante minociclina (Mino), un antibiótico que impide la activación de la microglía, a ratones NLRP3<sup>+/+</sup>, y se observaron los efectos del RS en estos. Concretamente, la muestra estaba formada por ratones NLRP3<sup>+/+</sup> que fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos, cada uno de los cuales representaba una condición experimental diferente. El grupo 1, estaba constituido por ratones NLRP3<sup>+/+</sup> expuestos a RS durante 30 días consecutivos y tratados con minociclina durante el mismo tiempo; el grupo 2, estaba formado por ratones NLRP3<sup>+/+</sup> expuestos a RS durante 30 días, tratados con solución salina (PBS); el grupo 3, constaba de ratones NLRP<sup>+/+</sup> no sometidos RS tratados con minociclina; y el grupo 4, lo formaban ratones NLRP3<sup>+/+</sup> no expuestos a RS, tratados con PBS. Los resultados mostraron que el tratamiento subcrónico con Mino impidió la activación microglial dependiente de RS (**Figura 14**).



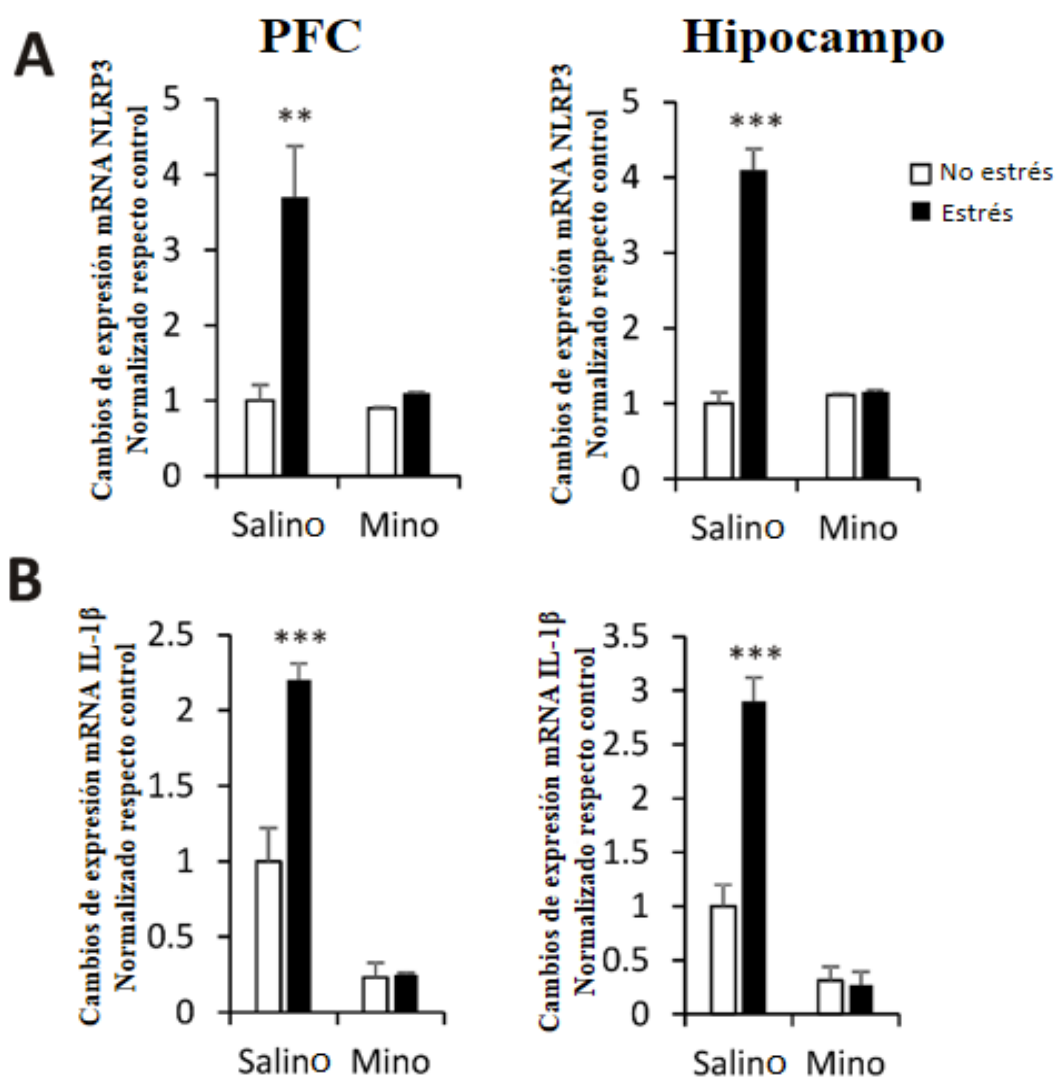
**Figura14. El tratamiento con minociclina inhibe la activación microglial inducida por RS.** Mostramos imágenes micrográficas del PFC y el hipocampo de cada grupo experimental. El tratamiento subcrónico con Mino bloqueó el incremento de la microglía inducida por el estrés. **\*\* $P < 0.01$** , ( $N \geq 6$  por grupo experimental).

Este incremento de microglía iba acompañado de un incremento del porcentaje de microglía activada (**Figura 15**).



**Figura 15.** El tratamiento con minociclina previene del aumento de microglía activa inducida por estrés. La activación microglial fue evaluado dependiendo de su morfología: las células polarizadas e hipertrofiadas son consideradas como activas. Los porcentajes de cada célula microglial en cada grupo experimental se representa por la media: \*  $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ , ( $N \geq 6$  para cada experimental grupo).

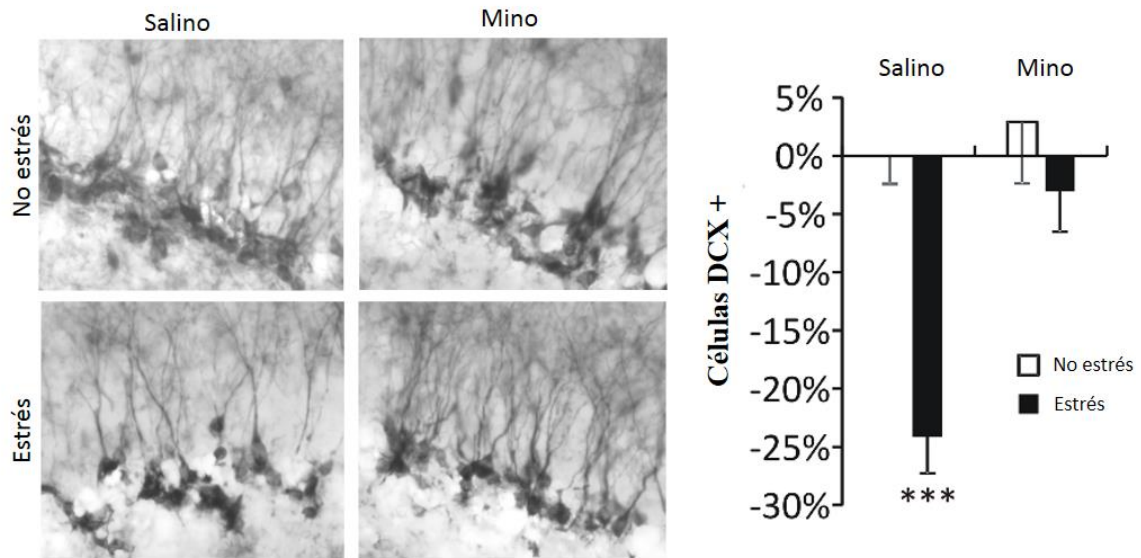
El análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes NLRP3 y de IL-1 $\beta$  en el PFC y el HP, ha puesto de manifiesto que el tratamiento con Mino previno del aumento de la expresión y activación del inflammasoma producida por RS (**Figura 16A y B**).



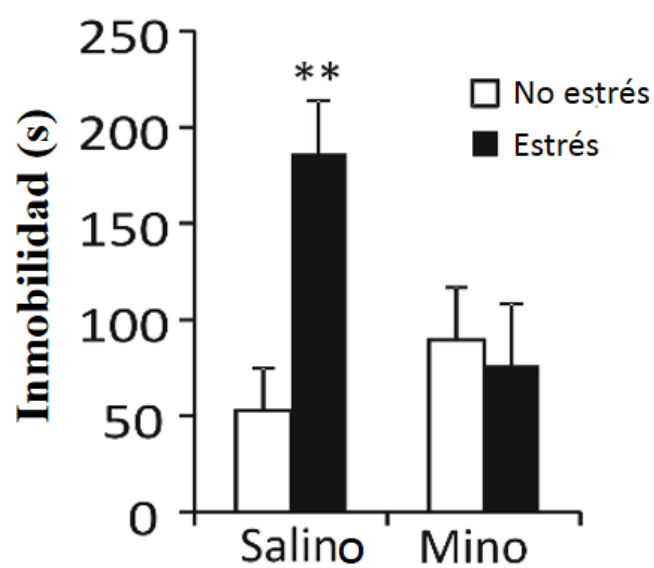
**Figura 16.** El tratamiento con Mino inhibe la aparición de los marcadores de neuroinflamación inducida por RS. **A.** La expresión del ARNm de los genes NLRP3 en el PFC y en el hipocampo del grupo control o de los ratones sometidos a RS en la presencia o ausencia de Mino. **B.** Cambios en IL-1β en el PFC y el hipocampo de los grupos control o de los ratones expuestos a RS en la presencia o ausencia de la administración de Mino: \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* y  $P < 0,001$ ; (N = 7 ratones por cada grupo experimental).

En consecuencia, los ratones sometidos a RS que recibieron Mino, no mostraron disminución de la neurogénesis (**Figura 17**) puesto de manifiesto por un mayor número de células DCX+ en el grupo Mino frente al grupo salino (PBS) sometido igualmente a

RS; así como tampoco exhibieron comportamientos depresivos en la prueba de natación forzada (**Figura 18**).



En esta figura se muestran los cambios en la densidad de las células DCX + en el hipocampo del grupo control o del grupo de los ratones sometidos a RS en la presencia o ausencia de Mino: \*\*\* $P < 0,001$  ( $N \geq 6$  ratones por cada grupo para ensayos histológicos).



**Figura 19. El tratamiento con Mino tratamiento previene la depresión inducida por RS.** El efecto de Mino sobre la depresión inducida por RS se determinó como el tiempo de inmovilidad del ratones en la prueba de natación forzada: \*\*  $P < 0,01$  ( $N \geq 6$  ratones por grupo).

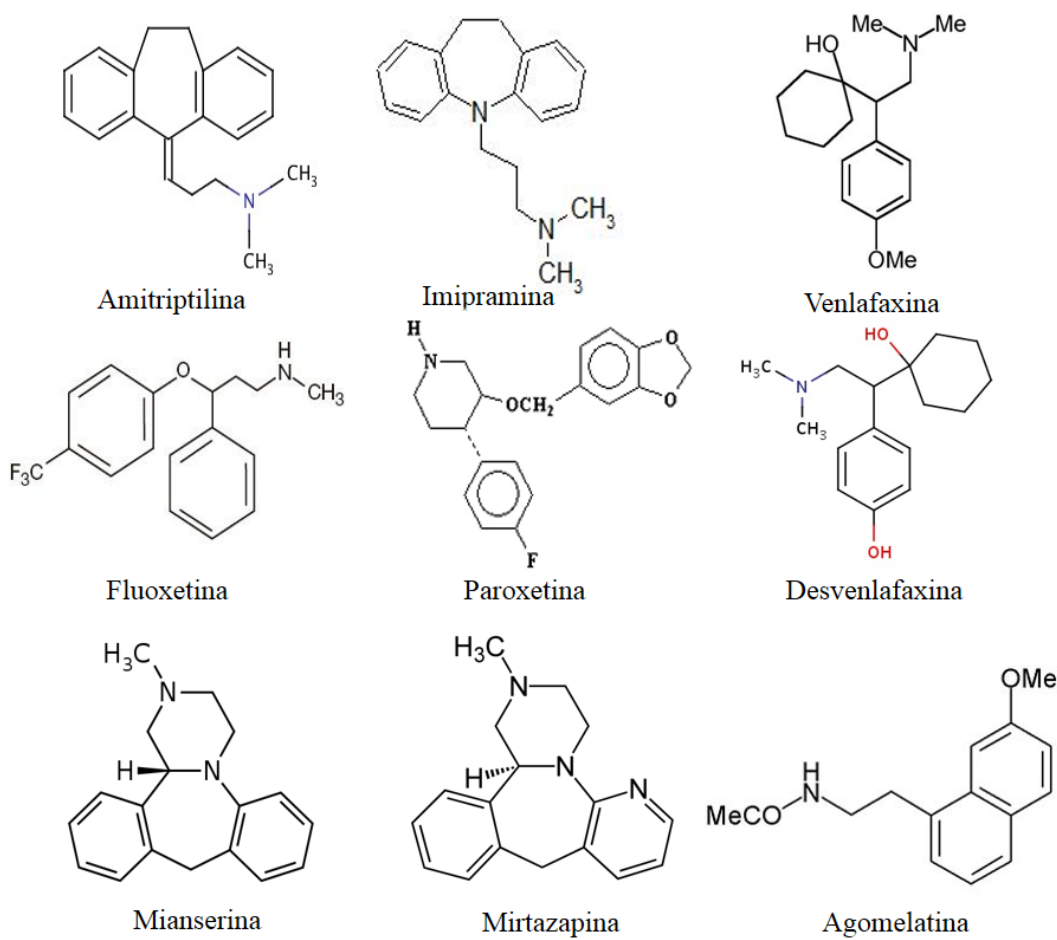
### ***PARTE 3: Efecto de los fármacos antidepresivos en la activación del complejo inflammasoma***

Aproximadamente un tercio de los pacientes responden adecuadamente a los tratamientos farmacológicos disponibles para el TDM (Thase, 2006). Los resultados obtenidos nos han llevado a plantearnos, si los antidepresivos podrían modular negativamente la expresión del complejo NLRP3-Inflamasoma. De esta forma podríamos proponer al complejo NLRP3-Inflamasoma como una posible diana terapéutica en el tratamiento de este trastorno, y como un biomarcador potencial para evaluar la efectividad o la resistencia de los pacientes ante determinados fármacos antidepresivos. Este aspecto lo hemos estudiado en un modelo *in vitro* de activación del inflammasoma, en un modelo murino de depresión por RS y en una muestra de pacientes con TDM en tratamiento con antidepresivos de diferentes familias.

#### **4.8. Los antidepresivos inhiben la activación del NLRP3-inflamasoma en modelos *in vitro***

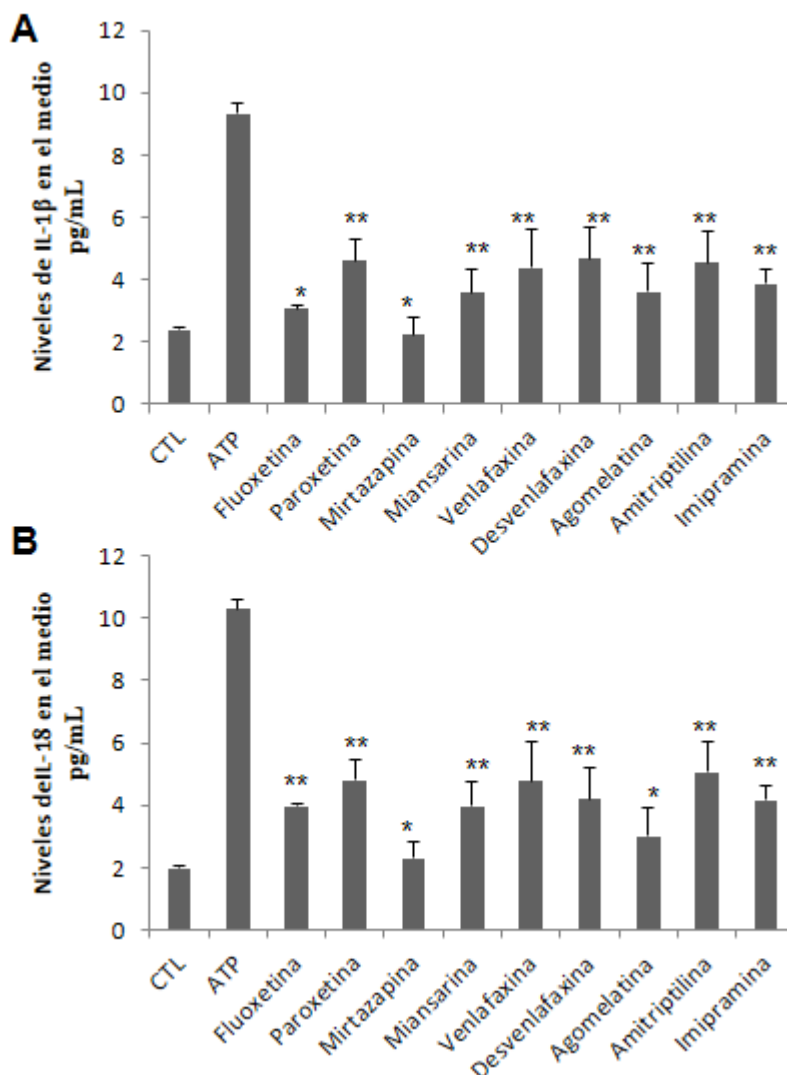
Como es conocido que el ATP es un potente inductor de la activación del inflammasoma buscar una referencia y poner, en nuestro estudio las células THP-1 en cultivo fueron incubadas durante 12 horas con ATP 5 mM y seguidamente se estudió el efecto del co-tratamiento con los siguientes antidepresivos: Fluoxetina y Paroxetina (ISRSs), Mianserina y Mirtazapina (TeCAs), Venlafaxina y Desvenlafaxina (IRSNs), Amitriptilina e Imipramina (ATCs) y Agomelatina (**Figura 20**). Todos los fármacos se utilizaron a una concentración 1  $\mu$ M con el objetivo de acercarse a los niveles clínicamente relevantes de estos antidepresivos en sangre.





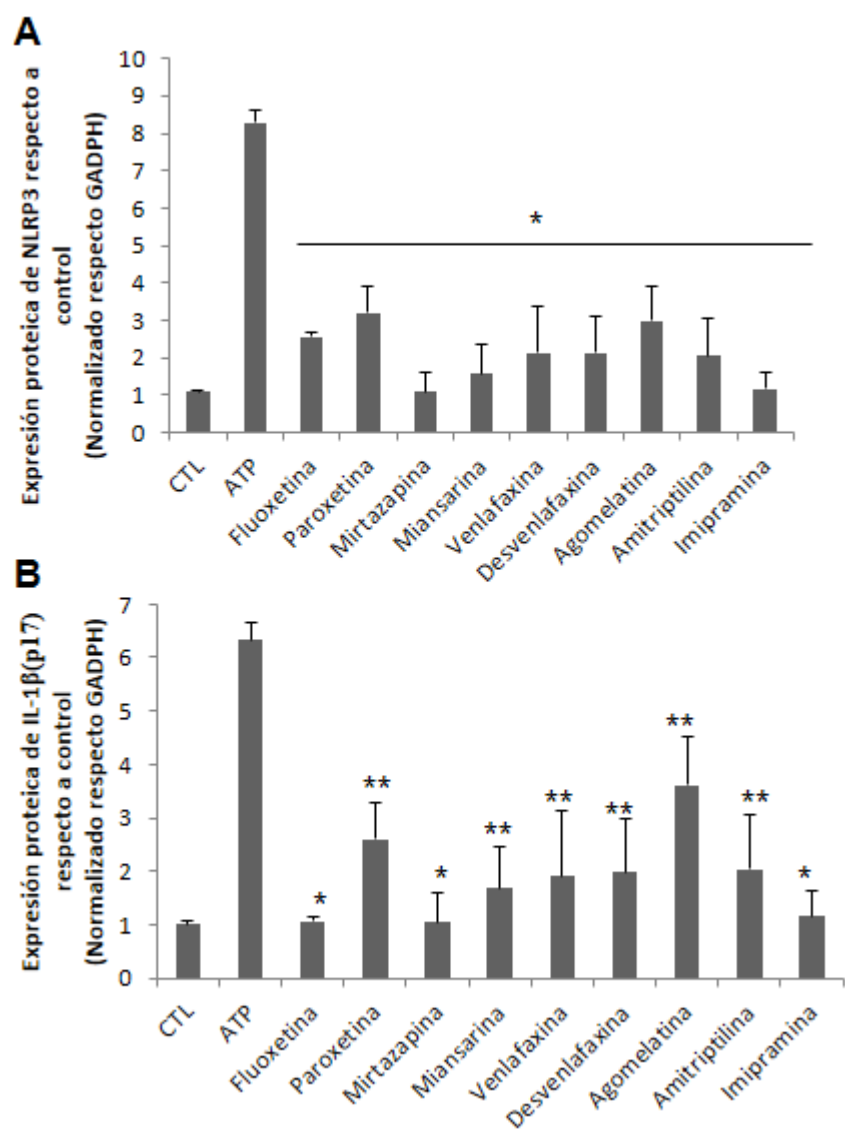
**Figura 20. Estructura molecular de los antidepresivos seleccionados.**

Los resultados mostraron que todos los antidepresivos redujeron la liberación de IL-1 $\beta$  y IL-18 en el medio inducida por el tratamiento con ATP. La reducción más significativa sobre IL-1 $\beta$  fue con Mirtazapina (TeCA) (76%) y Fluoxetina (ISRS) (67%). Mianserina (TeCA) y Agomelatina indujeron una reducción de alrededor del 61% de la IL-1 $\beta$ , Imipramina y Amitriptilina 59% (ATC), Paroxetina (ISRS), Venlafaxina y Desvenlafaxina (IRSN) indujeron aproximadamente un 51% de reducción de la liberación de IL-1 $\beta$  (**Figura 21A**). Resultados similares se observaron en los niveles de IL-18 (**Figura 21B**). Resulta interesante destacar que nuestros resultados no mostraron una correlación entre las familias de antidepresivos.



**Figura 21. Efecto de los antidepresivos sobre la liberación al medio de IL-1 $\beta$  y IL-18.** **A.** Los niveles de IL-1 $\beta$ , se determinaron en el medio de células THP-1 después del tratamiento con ATP 5 mM 12h en presencia o ausencia de 1 $\mu$ M de los diferentes antidepresivos. **B.** Los niveles de la IL-18 se determinaron en el medio de cultivo de células THP-1 después del tratamiento con ATP 5 mM 12h en presencia o ausencia de 1 $\mu$ M de los diferentes antidepresivos determinados por ELISA como se describe en Material y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes \* $P < 0,001$  y \*\* $P < 0,01$  entre ATP y el tratamiento con antidepresivos.

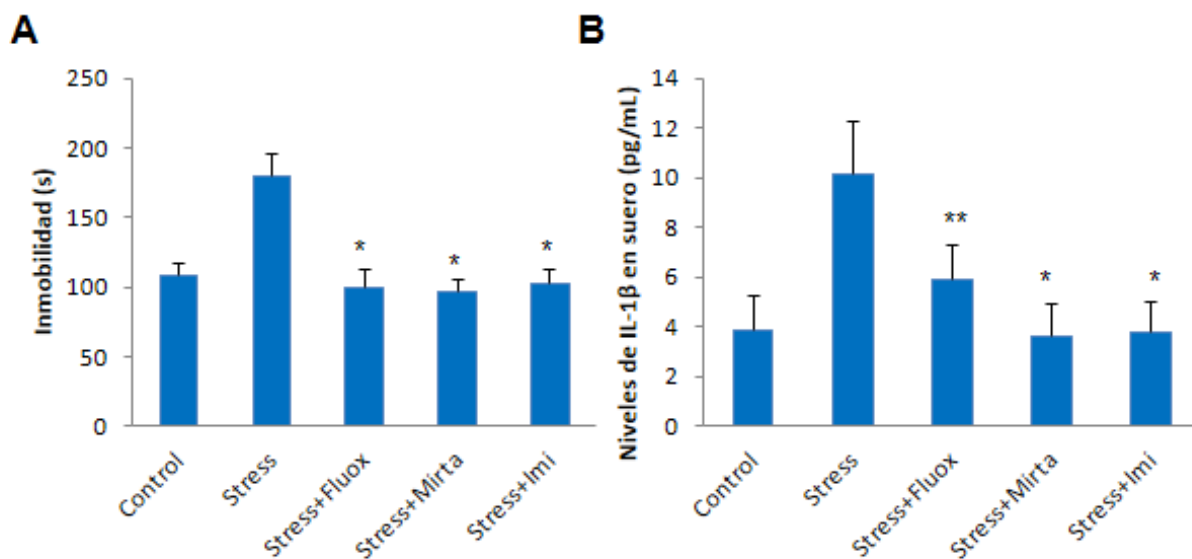
Como la IL-1 $\beta$  e IL-18 son los productos de la activación del inflamasoma, estudiamos mediante Western-Blot la expresión de las proteínas NLRP3 y la forma activa de la IL-1 $\beta$  (p17) en las células después del tratamiento con antidepresivos con respecto al tratamiento sólo con ATP. Los resultados mostraron que todos los antidepresivos impidieron el incremento de los niveles de sobreexpresión de las proteínas NLRP3 y de la forma activa de IL-1 $\beta$  (p17) inducido por ATP en células THP-1 (**Figura 22A y B**), continuando la tendencia observada en IL-1 $\beta$  e IL-18.



**Figura 22. Efecto de los antidepresivos en la activación NLRP3-inflamasoma.** A. Los niveles de expresión de NLRP3 se determinaron en células THP-1 después del tratamiento con ATP 5 mM 12h en presencia o ausencia de 1μM de los diferentes antidepresivos. B. Cuantificación de IL-1β (p17) (los niveles de proteína activos). Los datos representan la media ± SD de tres experimentos independientes. \*  $P < 0,001$  y \*\*  $P < 0,01$  entre ATP y el tratamiento antidepresivos.

#### 4.9. Los antidepresivos inhiben la activación del NLRP3-inflamasoma en modelos *in vivo* y pacientes con TDM

Con el fin de estudiar los efectos de los antidepresivos en la activación del inflamasoma en un modelo *in vivo* y de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, se utilizó un modelo animal de comportamientos relacionados con la depresión inducidos por estrés. Esto se realizó sometiendo a los ratones a RS durante 30 días. Para medir el comportamiento depresivo ocasionado por RS se utilizó la prueba de natación forzada ( $P < 0,001$ ) (**Figura 23A**). Los ratones sometidos a RS mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de IL-1β ( $P < 0,001$ ) en comparación con los controles (**Figura 23B**).



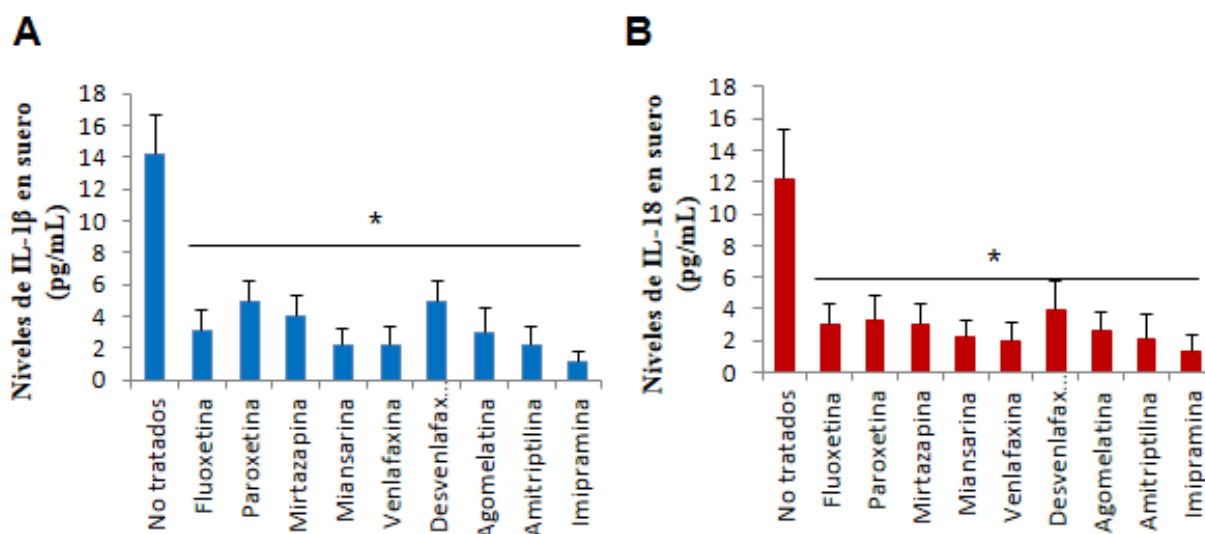
**Figura 23. Efecto de los antidepresivos en ratones previene RS-inducidos comportamientos depresivos. A.** La media de tiempo de inmovilidad. **B.** Niveles séricos de IL-1 $\beta$ . Los resultados están mostrados como la media  $\pm$  desviación estándar. \* p <0,001 y \*\* p <0,01 entre el grupo de estrés y antidepresivos (N = 10 para cada grupo).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los modelos *in vitro* e *in vivo*, hemos evaluado el efecto de los antidepresivos en varios pacientes depresivos tratados con todos los antidepresivos ensayados *in vitro*. Doscientos catorce pacientes con TDM se incluyeron en el estudio. La Tabla 2 muestra los datos de acuerdo con la distribución por edad y sexo de los pacientes.

**Tabla 2.** Características de los pacientes seleccionados

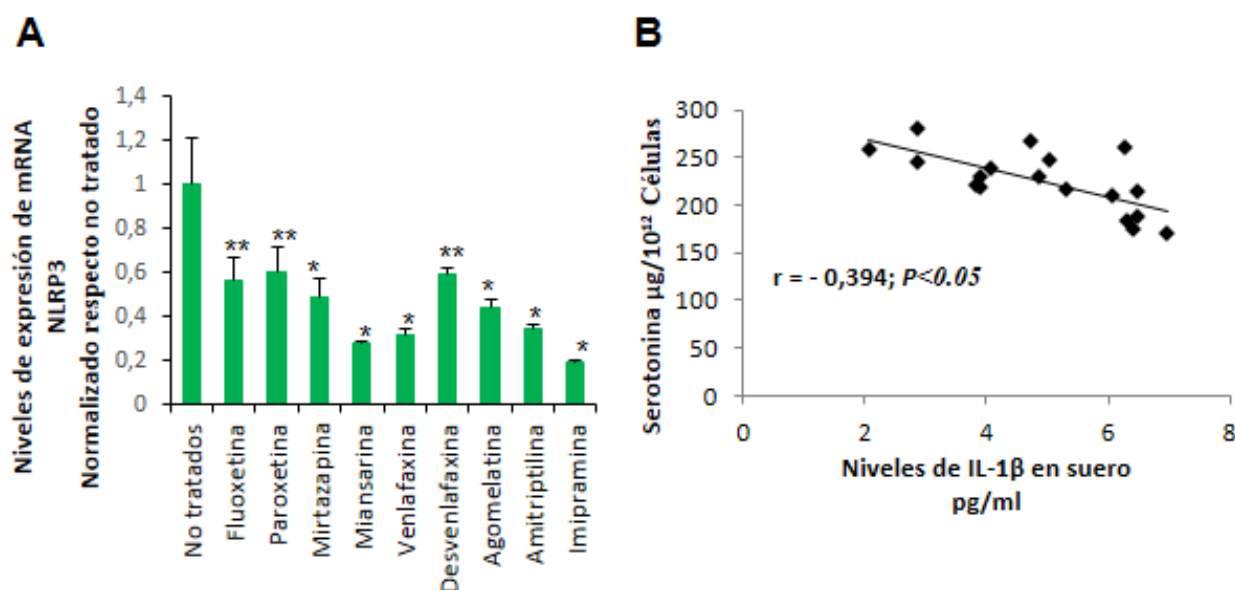
Parámetros	Control	TDM
Edad (años)	45.5 $\pm$ 6.1	46.1 $\pm$ 8
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 $\pm$ 2.5	22.9 $\pm$ 1.2
Sexo (Hombre/Mujer)	5/15	50/164
Mesesbajotrataamiento	---	7.1 $\pm$ 1.2
IL-1 $\beta$	3.2 $\pm$ 2.5	22.9 $\pm$ 1.2
IL-18	2.7 $\pm$ 1.5	26.6 $\pm$ 8.3

Los pacientes fueron distribuidos en grupos en base al tratamiento farmacológico recibido: No tratados (20 pacientes), fluoxetina (20 pacientes), paroxetina (17 pacientes), mianserina (18 pacientes), mirtazapina (15 pacientes), la venlafaxina (20 pacientes), desvenlafaxina (21 pacientes), amitriptilina (20 pacientes), imipramina (20 pacientes) y agomelatina (18 pacientes). Los resultados mostraron que los antidepresivos indujeron una reducción importante de la activación del inflamasoma manifestada por una inhibición de la IL-1 $\beta$  e IL-18 en suero (**Figura 24A y B**).



**Figura 24. Efecto de los antidepresivos en la activación inflamatoria de los pacientes con TDM. A y B.** Los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-18 en el suero de pacientes no tratados y tratados con TDM, se determinaron mediante ELISA como se describe en Material y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  entre el grupo de pacientes no tratados y los tratados con los diferentes antidepresivos.

Estos resultados en suero fueron acompañados por una disminución significativa en la expresión de ARNm de NLRP3 en las PBMCs (**Figura 25A**). Curiosamente, en una muestra representativa de 30 sujetos, los niveles séricos de IL-1 $\beta$  mostraron una alta correlación negativa con los niveles de serotonina en PBMCs de los pacientes con TDM tratados (**Figura 25B**). Estos datos sugieren que el aumento de los niveles de activación del inflammasoma puede ser un marcador biológico para la respuesta antidepresiva en el TDM.



**Figura 24. Efecto de los antidepresivos en la activación inflammasoma de los pacientes con TDMA.**

Los niveles de expresión de NLRP3 en relación con beta-actina se determinaron por PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en Material y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes \*  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  entre el grupo de pacientes no tratados y los tratados con los diferentes antidepresivos. **B.** La correlación de la IL-1 $\beta$  en el suero de pacientes con TDM con los niveles séricos de serotonina. La correlación fue establecida mediante el cálculo de los coeficientes de correlación.





## DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

El inflammasoma tiene un papel importante en la inmunidad innata, pero su activación aberrante está vinculada a enfermedades inflamatorias crónicas. Recientemente, el inflammasoma ha surgido como un marcador inesperado del estrés celular en general, y del estrés metabólico en particular (Iwata et al., 2013; Leemans et al., 2011). De hecho, el inflammasoma se ha implicado en el desarrollo de enfermedades tan prevalentes como la gota, la diabetes tipo-2 y la resistencia a la insulina inducida por la obesidad (Menu et al., 2011). Así mismo, cada vez hay más pruebas experimentales de que el complejo NLRP3-Inflamasoma puede jugar un papel importante en otras patologías humanas tales como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (Menu et al., 2011). Un denominador común de todas ellas patologías es la elevada comorbilidad que presentan con el TDM (Iwata et al., 2013).

En la primera parte de nuestro estudio, hemos encontrado un incremento de la activación del complejo NLRP3-Inflamasoma en las PBMCs de pacientes con TDM y un aumento de los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IL-18 que son las principales citoquinas activadas por este complejo. Los niveles de citoquinas hallados, confirman los estudios previos en la literatura que describen niveles elevados de estas citoquinas en el TDM (Schiepers et al., 2005; Leemans et al., 2011). La maduración y la liberación de IL-1 $\beta$  se ha relacionado con el estrés, la depresión y la disregulación del SNC (Iwata et al., 2013). En este sentido, ya es conocido que estas citoquinas pueden provocar síntomas somáticos como la fatiga y la pérdida de apetito, además de afectar al estado de ánimo, produciendo disforia y ansiedad, siendo todos estos, síntomas que coinciden con los síntomas comunes de la depresión mayor. (Schiepers et al., 2005). Por su parte, la IL-18 también se ha observado que exacerba la inflamación del SNC (Jha et al., 2010) y activa las vías de señalización pro-apoptóticas tanto intrínsecas como

extrínsecas (Chandrasekar et al., 2004). En relación con esto, cabe señalar que varios estudios han sugerido que la apoptosis desempeña un papel importante en la fisiopatología de la depresión (Shelton et al., 2011; Szuster-Ciesielska et al., 2008). A este respecto, la activación de la caspasa-1 conduce al procesamiento de la IL-1 $\beta$  e IL-18 a través de un proceso que se cree que es análogo a la formación del apoptosoma en respuesta a estímulos apoptóticos (Davis et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de que existe cierta evidencia sobre la presencia de marcadores inflamatorios en pacientes con depresión, las discrepancias aparecen cuando se intenta dilucidar si la inflamación es la causa de la depresión, o viceversa (Raison y Miller, 2011). Estas discrepancias desaparecen si se tiene en cuenta que la relación entre la depresión y la inflamación es de naturaleza bidireccional, es decir, el estrés psicológico y la depresión consecuente, realzan la inflamación y a su vez, la inflamación promueve la depresión. Como mediador de esa relación bidireccional podría encontrarse el complejo NLRP3-inflamasoma, ya que éste puede activarse tanto en situaciones de estrés psicológico, desencadenando toda la cascada de mediadores pro-inflamatorios, como en situaciones de estrés físico, desencadenando entonces los síntomas depresivos. Como apoyo a este papel mediador del inflamasoma, están los estudios realizados por Song et al., (2006) en el que demuestran que tras inyectar la IL-1 $\beta$  a ratones éstos desarrollaban comportamientos depresivos, y de manera contraria, el bloqueo de la IL-1 $\beta$  se ha mostrado suficiente para mitigar estos comportamientos depresivos y procesos celulares asociados que aparecen como resultado de la exposición a estrés crónico (Koo et al., 2008).

El tratamiento con antidepresivos reduce los niveles de niveles de la IL-1 $\beta$  en suero, pero no de TNF $\alpha$ , lo que sugiere que la IL-1 $\beta$  juega un papel importante en la respuesta al tratamiento (Hannestad et al., 2011) y podría ser utilizado como un potencial biomarcador

funcional de la depresión (Schmidt et al., 2011). En este sentido, en el presente trabajo se ha estudiado la activación del inflamasoma en pacientes con TDM tratados con amitriptilina y se encontró que los pacientes con TDM mostraron una reducción de los niveles séricos de la IL-1 $\beta$  e IL-18 y una reducción significativa en la activación de NLRP3 y de caspasa-1. Un análisis de correlación parcial mostró que la asociación de las puntuaciones en el BDI con los niveles en suero de las IL-1 $\beta$  e IL-18 se redujo cuando se controló estadísticamente la variable "tratamiento con antidepresivos", lo que sugiere que, algunos antidepresivos pueden modular los niveles de inflamación. En concordancia con estos resultados, se ha descrito que los TCA e ISRS normalizan los niveles séricos de citoquinas inflamatorias en los pacientes deprimidos (Kenis y Maes, 2002; Raedler, 2011) y que la amitriptilina tiene efectos anti-inflamatorios y reduce los niveles séricos de la IL-1 $\beta$  (Vismari et al., 2012).

Se ha descrito que el estrés metabólico como el estrés oxidativo y la producción de ROS pueden activar al inflamasoma (Zhou et al., 2011). Con el fin de explorar la implicación del estrés oxidativo en la inflamación mediada por el inflamasoma en los pacientes con TDM, se han determinado varios parámetros oxidativos en las PBMCs de pacientes con TDM. Los resultados han detectado un aumento de la producción mitocondrial de ROS y de la peroxidación lipídica en el grupo de pacientes no tratados. Sin embargo, no hemos observado correlación alguna entre la producción mitocondrial de ROS y la activación del inflamasoma. Además, el tratamiento con amitriptilina aumentó los niveles de estrés oxidativo a pesar de la reducción de la activación del inflamasoma. De acuerdo con estos datos, varios estudios han demostrado previamente que los antidepresivos como los TCA y los ISRS inducen estrés oxidativo y daño mitocondrial (Li et al, 2012; Moreno-Fernández et al, 2012; Hroudova y Fisar, 2010). Dado que existe una relación bidireccional entre las alteraciones mitocondriales y la inflamación, el debate surge de

nuevo al intentar aclarar si la relación entre la depresión y la inflamación se debe a una alteración primaria de las vías inflamatorias, o por el contrario, la inflamación se debe a una perturbación primaria de la función mitocondrial. Según nuestros datos, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en el TDM son eventos independientes para la activación del inflamasoma. Apoyando estos resultados, se ha descrito que varias citoquinas inflamatorias  $\text{TNF-}\alpha$  y la  $\text{IL1-}\beta$ , inducen disfunción mitocondrial (Mairappan et al., 2009; López-Armada et al., 2006).

Según nuestros datos, la disfunción mitocondrial no estaría involucrada en la activación del inflamasoma en pacientes con TDM, por ello proponemos dos hipótesis alternativas que según la literatura podrían explicar la activación del mismo. La primera de estas hipótesis, señala al estrés psicológico como activador de este complejo y por consiguiente de incrementar los niveles de  $\text{IL-1}\beta$  (Iwata et al., 2013) e  $\text{IL-18}$  (Kokai et al., 2002) en suero. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que el estrés psicológico podría inducir activación del inflamasoma son desconocidos. Una opción plausible para explicar estos mecanismos, sería explorar el papel de las moléculas que participan en la activación de NLRP3 inflamasoma tales como la liberación de ATP (Gombault et al., 2013). En este sentido, nosotros y otros grupos demostramos de un aumento de los niveles de ATP después de la exposición a estrés (Iwata et al., 2013), junto con la consecuente activación del inflamasoma. Igualmente plausible, sería investigar el papel de ciertas moléculas que están implicadas en la fisiopatología del TDM, como posibles inductoras de la activación de este complejo NLRP3-Inflamasoma en situaciones de estrés psicológico. En apoyo a esto, se ha descrito que existe una correlación entre elevados niveles de cortisol y elevados niveles de la  $\text{IL-1}\beta$  en patologías que cursan con una alteración el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), como sucede en la anorexia nerviosa (Limone et al., 2000), por lo que cabría esperar que en la depresión ocurriese lo mismo.

Una segunda hipótesis alternativa que podría explicar la activación del inflamasoma independiente de disfunción mitocondrial/estrés oxidativo que hemos encontrado en nuestro trabajo, sería la propuesta de Gold et al., (2012) que predice que una respuesta descontrolada de estrés del retículo endoplasmático (estrés del RE) podría contribuir a la patofisiología del TDM o del trastorno bipolar (Gold et al., 2012). En este sentido hay estudios que demuestran que el estrés del RE conduce a una activación del complejo NLRP3-inflamasoma (Menu et al., 2012). Curiosamente, ambas hipótesis propuestas podrían ser interconectadas porque hay resultados que ofrecen pruebas experimentales de una activación de los mecanismos de estrés del RE tras un estrés psicológico (Pavlovsky et al., 2013).

En la segunda parte de nuestro estudio, intentamos ir más allá en la comprensión de este fenómeno, y hemos evaluado la implicación del NLRP3-Inflamasoma y la activación microglial en el comportamiento depresivo inducido por estrés.

Está ampliamente aceptado que la depresión puede ser causada por desequilibrios neuroquímicos en diferentes regiones del cerebro, particularmente en el PFC y en el hipocampo, que están implicadas en el control del estado de ánimo, la ansiedad, la cognición y el miedo (Mahar et al., 2014). El deterioro de la neurogénesis del hipocampo y la activación microglial parecen estar asociados con el desarrollo de comportamientos depresivos inducidos por estrés (Banar et al., 2011; de Pablos et al., 2014). De acuerdo con esto, el RS ocasiona una disminución en el número de neuronas inmaduras en el giro dentado adulto, lo que sugiere una disminución de la neurogénesis, en correlación con el comportamiento depresivo. El efecto exacto del estrés en las diferentes etapas de la neurogénesis todavía no está claro, aunque los niveles aumentados de la IL-1 $\beta$  en el hipocampo pueden ser responsables de esta alteración de la neurogénesis, como ya se ha descrito con anterioridad (Koo et al., 2008, 2010; Zunszain et al., 2012). Esta hipótesis

sobre el efecto de la IL-1 $\beta$  en la neurogénesis, concuerda con nuestros datos que demuestran que la delección de NLRP3 o la inhibición de la microglía mediante minociclina, previenen del deterioro de la neurogénesis y del comportamiento depresivo inducido por el estrés, probablemente como consecuencia de la disminución de IL-1 $\beta$ .

El complejo NLRP3 inflamasoma se expresa constitutivamente en los macrófagos y como ya se sabe, las microglías son los macrófagos residentes en el SNC (Pan et al., 2014). Varios estudios recientes han demostrado que el estrés induce la activación microglial en varias regiones del SNC (Kreisel et al., 2014; de Pablos et al., 2014). Nuestros resultados han mostrado que el RS induce la activación del inflamasoma, junto con un incremento importante en la producción de ATP, uno de los estímulos más potentes que desencadenan la activación del inflamasoma (Ouyang et al., 2013) e inductor de la activación microglial (Inoue, 2008; Hanamsagar et al., 2011). Enfoques genéticos y farmacológicos han demostrado que la activación del NLRP3 inflamasoma en la microglía, induce la neuroinflamación por el incremento de IL-1 $\beta$  provocado por el estrés crónico (Pan et al., 2014). En nuestro estudio hemos demostrado que la activación microglial requiere de NLRP3 funcional y que la activación del NLRP3-Inflamasoma juega un papel fundamental en el desarrollo de comportamientos depresivos ocasionados por estrés en ratones. La depleción genética del inflamasoma, o la inhibición farmacológica de la activación de la microglia bloquean la reducción del número de neuronas inmaduras del hipocampo y menoscaban la activación microglial y el comportamiento depresivo inducido por estrés crónico. Nuestros resultados sobre los cambios microgliales en el PFC, pueden parecer observaciones contradictorias puesto que encontramos una disminución del número de células pero una mayor activación de las mismas, junto con un aumento en la expresión de la IL-1 $\beta$ . A pesar del menor número de microglía, la mayor



activación de éstas, podría explicar el incremento de la liberación de la IL-1 $\beta$  (Kettenmann et al., 2011).

Estos resultados indican que la activación de NLRP3 juega un papel fundamental en el desarrollo del comportamiento depresivo y las alteraciones moleculares y celulares asociadas con la depresión. Estos datos sugieren que el inflamasoma en la microglía es probablemente un elemento central en el desarrollo de comportamientos depresivos inducidos por el estrés, y por tanto, puede representar un nuevo objetivo terapéutico para el manejo de la depresión.

Como ya hemos comentado, una gran cantidad de pruebas experimentales que sugieren que el TDM está acompañado por la activación de las vías inflamatorias que se refleja por un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias, tales como la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF $\alpha$  (Dowlati et al., 2010; Maes et al., 1993; Rawdin et al., 2012). Sin embargo, se ha encontrado que el tratamiento antidepresivo reduce los niveles séricos de la IL-1 $\beta$ , pero no del TNF $\alpha$  y la IL-6, lo que sugiere que la IL-1 $\beta$  juega un papel importante en la respuesta al tratamiento (Hannestad et al., 2011) y puede ser utilizado como un potencial biomarcador de la depresión (Schmidt et al., 2011). Debido a que la IL-1 $\beta$  es una citoquina activada por el complejo inflamasoma, en la tercera parte de nuestro estudio, hemos hipotetizado sobre la implicación del inflamasoma en la eficacia del tratamiento antidepresivo. En este sentido, los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias parecen predecir la falta de respuesta futura a los antidepresivos (Cattaneo et al., 2013). Recientemente, el estudio GENDEP (un estudio realizado sobre las drogas terapéuticas basadas en el genoma para el estudio de la depresión) demostró la utilidad de la expresión génica de varios genes seleccionados, incluidos los genes inflamatorios para evaluar la respuesta antidepresiva (Cattaneo et al., 2013). Nuestro estudio ha demostrado un posible efecto inhibitor de diferentes antidepresivos sobre la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 en

pacientes, en células y en un modelo animal de depresión inducida por el estrés. Esta liberación de citoquinas fue acompañada por la expresión de proteínas de NLRP3, el principal inductor del inflamasoma en situaciones de estrés y una reducción de la expresión de ARNm de NLRP3 en pacientes con TDM tratados con diferentes antidepresivos corroborando los resultados obtenidos *in vitro*. Esto tiene implicaciones sobre la utilidad de la determinación de los niveles de NLRP3 para evaluar la respuesta antidepresiva. Nuestros resultados no muestran una correlación entre las familias de antidepresivos y la reducción del inflamasoma, mostrando un grado de inhibición diferente con diferentes drogas de la misma familia. A partir de estos hallazgos, nuestros datos apoyan la idea de un enfoque médico personalizado para el tratamiento de la depresión en función del grado de activación del inflamasoma en cada paciente.

Nuestros datos muestran también una correlación negativa entre el contenido de serotonina en las PBMCs y la liberación de la IL-1 $\beta$  en los pacientes tratados, que podemos interpretar como una recuperación del nivel de serotonina en consonancia a la inhibición del inflamasoma. En este sentido, varios estudios han demostrado que las citoquinas alteran las concentraciones de neurotransmisores, resultando en una respuesta hiposerotoninérgica en varios procesos psiquiátricos como la depresión o el trastorno obsesivo-compulsivo (Reus et al, 2015; Rao et al, 2015). La investigación sobre el papel de la degradación del triptófano y la vía quinurenina en el entorno de la inflamación, ha traído una nueva visión de las posibles etiologías del TDM y podría explicar nuestros datos sobre la disminución de la serotonina en función del incremento de la activación del inflamasoma (Réus et al., 2015).

Dada la importancia atribuida a la neuroinflamación en la patogénesis del TDM, la inmunomodulación ha surgido como una potencial vía en el tratamiento de este trastorno. En nuestro estudio hemos probado varios antidepresivos diferentes pero el mecanismo

molecular por el que los antidepresivos inhiben el complejo inflammasoma sigue siendo difícil de alcanzar y podría deberse a diferentes mecanismos. Se sabe que las células gliales son una fuente importante de citoquinas inflamatorias del SNC (Ransohoff y Brown, 2012) y que la IL-1 $\beta$  se libera principalmente por microglia y macrófagos (Mason et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que la microglia es responsable de la activación de NLRP3 inflammasoma y de la inflamación del SNC producida por la liberación de la IL-1 $\beta$  (Pan et al., 2014). Por esta razón, el efecto del tratamiento antidepresivo sobre la regulación de la microglia podría explicar el efecto antiinflamatorio de estos fármacos (Dubovický et al, 2014;.. Ramírez et al, 2015; Lee et al, 2015).

Nuestro estudio muestra resultados consistentes con estudios previos que describen el efecto antiinflamatorio de los diferentes antidepresivos (Schulz et al, 2012; Horowitz et al, 2014). Sin embargo, éste es el primer estudio que muestra un efecto comparativo de los diferentes antidepresivos en experimentos realizados in vitro e in vivo, sobre la activación del complejo inflammasoma, en dosis clínicamente apropiadas.

Para concluir, nuestro estudio propone al complejo NLRP3-inflammasoma como un biomarcador para evaluar la respuesta al tratamiento antidepresivo en pacientes con TDM. La monitorización de los niveles de expresión de NLRP3 y/o de la liberación de la IL-1 $\beta$ /IL-18 podría ayudar a la elección del antidepresivo adecuado.

A pesar de los resultados, somos conscientes de algunas limitaciones de nuestro estudio, como el pequeño tamaño de las muestras evaluadas o que no hayan sido controlados factores como el consumo de alimentos o la posible pérdida de peso de los sujetos que pueden haber influido en los datos. Además, hubiese sido conveniente analizar la activación del inflammasoma en muestras post-mortem de cerebros de pacientes con TDM y no sólo en las PBMCs y suero, para obtener datos más fehacientes de la inflamación en

el SNC. Por otro lado, es necesario profundizar más en los mecanismos que se encuentran detrás de esta activación del inflamasoma y del resto de alteraciones que se han visto involucradas en la fisiopatología del TDM. En este sentido, actualmente estamos investigando el papel regulador de la AMPK, una proteinquinasa dependiente de AMP, considerada un regulador esencial del metabolismo ,cuya fosforilación induce una cascada de eventos como la biogénesis mitocondrial, la síntesis de antioxidantes, el control de la inflamación, etc (Hardie, 2008). Por tanto, la AMPK adquiere relevancia como un posible mecanismo de control de la mayoría de los factores fisiopatogénicos de la depresión, en cuanto a que una alteración en la fosforilación de AMPK, induciría un descenso de la biogénesis mitocondrial y reducción de la síntesis de ATP y capacidad antioxidante, así como un incremento en factores oxidativos e inflamatorios. Sin embargo, no existen datos experimentales que demuestren si la deficiente activación de la AMPK induciría síntomas depresivos. En la actualidad nuestro grupo está trabajando en esta dirección.

## CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El complejo NLRP3-Inflamasoma se encuentra activado en PBMCs de los pacientes con TDM.
2. Existen altos niveles de estrés oxidativo en los pacientes con TDM, sin embargo, estos niveles no son responsables de la activación del complejo NLRP3-Inflamasoma en estos pacientes.
3. Los niveles séricos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 correlacionan con la gravedad de la depresión medida mediante el BDI.
4. El desarrollo de síntomas depresivos inducidos por estrés requiere de la activación del complejo NLRP3-Inflamasoma.
5. Los síntomas depresivos que acompañan a la activación de la microglía inducida por estrés, requieren de la activación de NLRP3-Inflamasoma.
6. La disminución de la neurogénesis que acompaña a la depresión inducida por estrés requiere de la activación del complejo inflammasoma.
7. Los antidepresivos comúnmente utilizados en la práctica clínica, tienen potencial para inhibir la activación del complejo NLRP3-Inflamasoma, independientemente de la familia a la que pertenezcan tanto en modelos in vitro como in vivo.
8. NLRP3-Inflamasoma podría ser utilizado como un biomarcador para evaluar la respuesta al tratamiento con antidepresivos en pacientes con TDM.





# BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012.

Aguilera M, Arias B, Wichers M, Barrantes-Vidal N, Moya J, Villa H, van Os J, Ibáñez MI, Ruipérez MA, Ortet G, Fañanás L. Early adversity and 5-HTT/BDNF genes: new evidence of gene-environment interactions on depressive symptoms in a general population. *Psychol Med.* 39: 1425-32, 2009.

Ahmedani BK, Peterson EL, Wells KE, Williams LK. Examining the relationship between depression and asthma exacerbations in a prospective follow-up study. *Psychosom Med.* 75: 305–10, 2013.

Akin D, Manier DH, Sanders-Bush E, Shelton RC. Decreased serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor-stimulated phosphoinositide signaling in fibroblasts from melancholic depressed patients. *Neuropsychopharmacol.* 29: 2081–7, 2004.

Alavi M, Grebely J, Matthews GV, Petoumenos K, Yeung B, Day C, et al. Effect of pegylated interferon-alpha-2a treatment on mental health during recent hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 27: 957–65, 2012.

Al-Mousawi AH, Evans N, Ebmeier KP, Roeda D, Chaloner F, Ashcroft GW. Limbic dysfunction in schizophrenia and mania. A study using 18F-labelled fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Br J Psychiatry.* 169: 509–516, 1996.

Alonso J, Angermeyer MC, Bernert S, Bruffaerts R, Brugha T S, Bryson H, de Girolamo G, Graaf R, Demyttenaere K, Gasquet I, Haro JM, Katz SJ, Kessler RC, Kovess V, Lépine JP, Ormel J, Polidori G, Russo LJ, Vilagut G, Almansa J, Arbabzadeh-Bouchez S, Autonell J, Bernal M, Buist-Bouwman MA, Codony M,

Domingo-Salvany A, Ferrer M, Joo SS, Martínez-Alonso M, Matschinger H, Mazzi F, Morgan Z, Morosini P, Palacín C, Romera B, Taub N, Vollebergh W A. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMED) project. *Acta Psychiatrica Scandinavica.*, Suppl 109: 21-27, 2004a.

American Psychiatric Association. Depressive disorders. In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed., Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.

Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, Zunszain PA, Horowitz M, Molteni R, Luoni A, Calabrese F, Tansey K, Gennarelli M, Thuret S, Price J, Uher R, Riva MA, Pariante CM. Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 8708–8713, 2013.

Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 153:27–32, 2007.

Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, et al. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 34: 263–71, 2009.

Anglin RE, Mazurek MF, Tarnopolsky MA, Rosebush PI. The mitochondrial genome and psychiatric illness. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B:749–759. 2012a.

Angst F, Stassen HH, Clayton PJ, Angst J. Mortality of patients with mood disorders: follow-up over 34–38 years. *J Affect Disord*. 68:167–81, 2002.

Ayuso Mateo, JL. Depresión: una prioridad en salud pública. *Med Clin (Barc)*. 123: 181-6, 2004.

Ayuso JL. Concepto y clasificación. Aspectos epidemiológicos y significado socioecoómico de la depresión. *Salud Rural*. 3: 107-9, 1999.

Bakish D, Cavazzoni P, Chudzik J, Ravindram A, Hrdina PD. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 41: 184-90, 1997.

Banasr M, Duman RS. Cell growth and survival in the pathophysiology and treatment of depression. *Curr Opin Mol Cell Neurosci*. 91: 333–338, 2011.

Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, Beggs ML (2007) Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J Neurochem*. 101: 1205–1213, 2007.

Barkai AI, Dunner DL, Gross HA, Mayo P, Fieve RR. Reduced myo-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol Psychiatry*. 13: 65–72, 1978.

Beasley CL, Pennington K, Behan A, Wait R, Dunn MJ, Cotter D. Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: evidence for disease-associated changes. *Proteomics*. 6:3414–3425, 2006.

Beckman G, Beckman L, Cedergren B, Perris C, Strandman E. Serum protein and red cell enzyme polymorphisms in affective disorders. *Hum Hered*. 28: 41-7, 1978.

Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *J. Endotoxin Res*. 9:3–24, 2003.

Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*. 358: 55-68, 2008.

- Bergemann ER, Boles RG. Maternal inheritance in recurrent early onset depression. *Psychiatr Genet*. 20: 31–34, 2010.
- Berk M, Conus P, Lucas N, Hallam K, Malhi GS, Dodd S, Yatham LN, Yung A, McGorry P. Setting the stage: from prodrome to treatment resistance in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 9: 671–8, 2007a.
- Berk M, Hallam KT, McGorry PD. The potential utility of a staging model as a course specifier: a bipolar disorder perspective. *J Affect Disord*. 100: 279–81, 2007b.
- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*. 238: 524–526, 1987.
- Bernal M, Haro JM, Bernert S, Brugha T, de Graaf R, Bruffaerts R, Lépine JP, de Girolamo G, Vilagut G, Gasquet I, Torres JV, Kovess V, Heider D, Neeleman J, Kessler R, Alonso J. Risk factors for suicidality in Europe: results from the ESEMED study. *J Affect Disord*. 101: 27-34, 2007.
- Birerdinc A, Afendy A, StepanovaM, Younossi I, Baranova A, Younossi ZM. Gene expression profiles associated with depression in patients with chronic hepatitis C (CH C). *Brain Behav*. 2: 525–31, 2012.
- Birkenhager TK, Moleman P, Nolen WA. Benzodiazepines for depression?. A review of the literature. *Int Clin Psychopharmacol*. 10: 181-95, 1995.
- Blier P, De Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharm Sci*.15: 220-6, 1994.
- Blume J, Douglas SD, Evans DL. Immune Suppression and Immune Activation in Depression. *Brain Behav Immun*. 25: 221–229, 2012.

- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39: 3–18, 2013.
- Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene.* 286: 127–34, 2002.
- Boles RG, Burnett BB, Gleditsch K, Wong S, Guedalia A, Kaariainen A, Eloed J, Stern A, Brumm V. A high predisposition to depression and anxiety in mothers and other matrilineal relatives of children with presumed maternally inherited mitochondrial disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 137B: 20–24, 2005.
- Bosbach S, Kornblum C, Schröder R, Wagner M. Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns–Sayre syndrome. *Brain.* 126: 1231–40, 2003.
- Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Nazeer A, Adil J, Khan S, Staib LH, Charney DS. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry.* 51: 273–279, 2002.
- Brydon L, Walker C, Wawrzyniak A, Whitehead D, Okamura H, Yajima J, Tsuda A, Steptoe A. Synergistic effects of psychological and immune stressors on inflammatory cytokine and sickness responses in humans. *Brain Behav Immun.* 23: 217–24, 2009.
- Bunney WE, Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions: A review. *Arch Gen Psychiatry.* 13: 483–94, 1965.
- Burnett BB, Gardner A, Boles RG. Mitochondrial inheritance in depression, dysmotility and migraine? *J Affect Disord.* 88: 109–116, 2005.
- Campbell S, MacQueen G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Current Opinion in Psychiatry.* 19: 25–33, 2006.

Capuron L, Neurauter G, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Fuchs D, Miller AH. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry*. 54: 906–14, 2003.

Capuron L, Ravaud A, Miller AH, Dantzer R. Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferonalpha cancer therapy. *Brain Behav Immun*. 18: 205–13, 2004.

Carlsson A, Fuxe K, Ungerstedt U. The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons. *J Pharm Pharmacol*. 20: 150-1, 1968.

Carlson PJ, Singh JB, Zarate CA JR, Drevets WC, Manji HK. Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx*. 3: 22–41, 2006.

Cassano P, Hidalgo A, Burgos V, Adris S, Argibay P. Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). *Pharmacogenomics J*. 6: 381–7, 2006.

Caspi A, Reichenberg A, Weiser M, Rabinowitz J, Kaplan Z, Knobler H, Davidson-Sagi N, Davidson M. Cognitive performance in schizophrenia patients assessed before and following the first psychotic episode. *Schizophr Res*. 65: 87-94, 2003.

Cattaneo A, Gennarelli M, Uher R, Breen G, Farmer A, Aitchison KJ, Craig IW, Anacker C, Zunsztain PA, McGuffin P, Pariante, CM. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology*. 38: 377-85, 2013.



- Chandrasekar B, Vemula K, Surabhi RM, Li-Weber M, Owen-Schaub LB, Jensen LE, Mummidu S. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J Biol Chem.* 279: 20221–20233, 2004.
- Charney DS, Menkes DB, Heninger GR. Receptorsensitivity and the mechanism of action of antidepressant treatment. Implications for the etiology and therapy of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 38: 1160-80, 1981.
- Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 1147: 395–412, 2008.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61: 192–208, 2004.
- Chen F, Wegener G, Madsen TM, Nyengaard JR. Mitochondrial plasticity of the hippocampus in a genetic rat model of depression after antidepressant treatment. *Synapse (New York, NY).* 67: 127–134, 2013.
- Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial medicine. *QJM.* 90: 657–67, 1997.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci.* 113: 902–913, 1999.
- Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry.* 113:1237-64, 1967.
- Covic T, Cumming SR, Pallant JF, Manolios N, Emery P, Conaghan PG, Tennant A.. Depression and anxiety in patients with rheumatoid arthritis: prevalence rates based on a comparison of the depression, anxiety and stress scale (DASS) and the hospital, anxiety and depression scale (HADS). *BMC Psychiatry.* 12:6, 2012.

Coyne JC. Toward and interactional description of depression. *Psychiatry*. 39: 28-40, 1976.

Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlidag R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Psychiatry Clin Neurosci*. 63: 639–45, 2009.

Dahl J, Ormstad H, Aass HC, Malt UF, Bendz LT, Sandvik L, Brundin L, Andreassen OA. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology*. 45: 77–86, 2004.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 9: 46–56, 2008.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 29: 707–735, 2011.

de Pablos RM, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Muñoz MF, Machado A, Venero JL. Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation*. 11: 34, 2014.

Depression. Internet Geneva: World Health Organization. Disponible en: [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/), 2007.

Deschwenden A, Hasler G. Metabotropic glutamate receptor 5: role in depression? Presented at the 22nd European College of Neuropsychopharmacology Meeting, Istanbul, May 2009.

DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 31: 91-123, 2008.

Dinan TG. Inflammatory markers in depression. *Current opinion in psychiatry*. 22: 32–6, 2009.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*. 67: 446–57, 2010.

Dubovický M, Császár E, Melicherčíková K, Kuniaková M, Račková L. Modulation of microglial function by the antidepressant drug venlafaxine. *Interdiscip Toxicol*. 7: 201-7, 2014.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 54: 597-606, 1997.

Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry*. 46: 1181-91, 1999.

Duman RS. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European Psychiatry*. 17: 306–310, 2002.

Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev*. 29: 891–909, 2005.

Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 5: 433–449, 2009.

Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D. Omega-3polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord*. 48: 149–55, 1998.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF

val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 112: 257-69, 2003.

Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Tanako Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav Brain Res*. 178: 123-127, 2007.

Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13632–13637, 2003.

Ekdahl CT. Microglial activation – tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol*. 3: 41, 2012.

Eren I, Naziroğlu M, Demirdağ A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res*. 32: 1188–95, 2007a.

Eren I, Naziroğlu M, Demirdağ A, Celik O, Uğuz AC, Altunbaşak A, Özmen I, Uz E. Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochem Res*. 32: 497–505, 2007b.

Eser D, Schule C, Baghai TC, Romeo E, Rupprecht R. Neuroactive steroids in depression and anxiety disorders: clinical studies. *Neuroendocrinology*. 84: 244–54, 2006.

Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, Nemeroff, CB, Bremner JD, Carney RM, Coyne JC, Delong MR, Frasure-Smith N, Glassman AH, Gold PW, Grant I, Gwyther L, Ironson G, Johnson RL, Kanner AM, Katon WJ, Kaufmann PG, Keefe FJ, Ketter T, Laughren TP, Leserman J, Lyketsos CG, McDonald WM, McEwen BS, Miller AH, Musselman D, O'Connor

- C, Petitto JM, Pollock BG, Robinson RG, Roose SP, Rowland J, Sheline Y, Sheps DS, Simon G, Spiegel D, Stunkard A, Sunderland T, Tibbits Jr P, Valvo WJ. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*. 58: 175–189, 2005.
- Fattal O, Link J, Quinn K, Cohen BH, Franco K. Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. *CNS Spectr*. 12: 429–438, 2007.
- Feng Z, HuW, Marnett LJ, Tang MS. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat Res*. 601: 125–36, 2006.
- Fenton WS, Stover ES. Mood disorders: cardiovascular and diabetes comorbidity. *Curr Opin Psychiatry*. 19: 421–7, 2006.
- Ferrier IN, McKeith IG, Cross AJ, Perry EK, Candy JM, Perry RH. Postmortem neurochemistry. *Biol Psychiatry*. 39:1044-50, 1996.
- Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33: 70-5, 2009.
- File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. 62: 19-24, 1978.
- File SE, Hyde JR. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of other minor tranquilisers and of stimulants. *Pharmacol Biochem Behav*. 11: 65-9, 1979.
- Finsterer J. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol*. 11: 163–86, 2004.

- Fitzgerald PB, Laird AR, Maller J, Daskalakis ZJ. A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum Brain Mapp.* 29: 683-95, 2008.
- Forester BP, Harper DG, Jensen JE, Ravichandran C, Jordan B, Renshaw PF, Cohen BM. 31 Phosphorus magnetic resonance spectroscopy study of tissue specific changes in high energy phosphates before and after sertraline treatment of geriatric depression. *Int J Geriatr Psychiatry.* 24: 788–797, 2009.
- Frol AB, Vasquez A, Getahun Y, Pacheco M, Khan DA, Brown ES. A comparison of clinician-rated neuropsychological and self-rated cognitive assessments in patients with asthma and rheumatologic disorders. *Allergy Asthma Proc.* 34: 170–5, 2013.
- Gałecki P, Kedziora J, Florkowski A, Gałecka E. Lipid peroxidation and copper-zinc superoxide dismutase activity in patients treated with fluoxetine during the first episode of depression. *Psychiatr Pol.* 41: 615–24, 2007.
- Gałecki P, Szemraj J, Bieńkiewicz M, Zboralski K, Gałecka E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Hum Psychopharmacol.* 24: 277–86, 2009a.
- Gałecki P, Szemraj J, Bieńkiewicz M, Florkowski A, Gałecka E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep.* 61: 436–47, 2009b.
- Gałecki P, Florkowski A, Bieńkiewicz M, Szemraj J. Functional polymorphism of cyclooxygenase-2 gene (G-765C) in depressive patients. *Neuropsychobiology.* 62: 116–20, 2010.
- Gałecki P, Śmigielski J, Florkowski A, Bobińska K, Pietras T, Szemraj J. Analysis of two

polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene:Ile-58Thr and Ala-9Val in patients with recurrent depressive disorder. *Psychiatry Res.* 179:43-6, 2010.

Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hällström T. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord.* 76: 55–68, 2003.

Gardner A, Boles RG. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 35: 730–743, 2011.

Ghattas A, Griffiths HR, Devitt A, Lip GY, Shantsila E. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol.* 62: 1541–51, 2013.

Gelder M, Harrison P, Cowen P. Mood disorders. In *Shorter oxford textbook of psychiatry*. New York: Oxford university Press Inc., 2006.

Gigliucci V, Buckley KN, Nunan J, O'Shea K, Harkin A. A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-Nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav.* 94: 524–33, 2010.

Gilmer WS, Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Luther J, Howland RH, Yohanna D, Khan A, Alpert J. Factors associated with chronic depressive episodes: a preliminary report from the STAR-D project. *Acta Psychiatrica Scandinavica.* 112: 425–433, 2005.

Gold PW, Licinio J, Pavlatou MG. Pathological parainflammation and endoplasmic reticulum stress in depression: potential translational targets through the CNS insulin, klotho and PPAR- $\gamma$  systems. *Mol Psychiatry.* 18: 154–165, 2012.

- Goldberg JF, Burdick KE, Endick CJ. Preliminary randomized, double-blind, placebo- controlled trial of pramipexole added to mood stabilizers for treatment-resistant bipolar depression. *Am J Psychiatry*. 161:564-6, 2004.
- Gombault A, Baron L, Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol*. 3: 414, 2013.
- Gong Y, Chai Y, Ding JH, Sun XL, Hu G. Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. *Neurosci Lett*. 488: 76–80, 2011.
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, and Vahip S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 255: 381–386, 2005.
- Goodwin PK, Bunney WE. Depression following reserpine: a re-evaluation. *Semin Psychiatry*. 3: 435-448, 1971.
- Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Review. *Mol Diagn*. 8: 141-9, 2004.
- Graff LA, Walker JR, Bernstein CN. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management. *Inflamm Bowel Dis*. 15: 1105–18, 2009.
- Grigoleit JS, Kullmann JS, Wolf OT, Hammes F, Wegner A, Jablonowski S, Engler H, Gizewski E, Oberbeck R, Schedlowski M. Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. *PLoS One*. 6: e28330, 2011.
- Gutierrez B, Pintor L, Gasto C, Rosa A, Bertranpetit J, Vieta E, Fañanás L. Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. *Hum Genet*. 103: 319-22, 1998.



- Guo JY, Li CY, Ruan YP, Sun M, Qi XL, Zhao BS, Luo F. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 612: 54–60, 2009.
- Hanamsagar R, Torres V, Kielian T. Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *J Neurochem.* 119: 736–748, 2011.
- Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a metaanalysis. *Neuropsychopharmacology.* 36: 2452–2459, 2011.
- Hardie DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond).* 32 Suppl 4: 7-12, 2008.
- Harlow BL, Wise LA, Otto MW, Soares CN, Cohen LS. Depression and its influence on reproductive endocrine and menstrual cycle markers associated with perimenopause: the harvard study ofmoods and cycles. *Archives of General Psychiatry.* 60: 29–36, 2003.
- Haro JM, Palacin C, Vilagut G, Martinez M, Bernal M, Luque I, Codony M, Dolz M, Alonso J. Prevalencia de los trastornos mentales y factores asociados: resultados del estudio ESEMeD-Espana. *Med Clin (Barc).* 126: 445-51, 2006.
- Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev.* 36: 363–75, 2004.
- Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology.* 33: 191–206, 2012.
- Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major

depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*. 64: 193-200, 2007.

Hasler G, van der Veen JW, Grillon C, Drevets WC, Shen J. Effect of acute psychological stress on prefrontal gamma-aminobutyric acid concentration determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 167: 1226-31, 2010.

He Y, Tang J, Li Z, Li H, Liao Y, Tang Y Tan L, Chen J, Xia K, Chen X. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in blood is not associated with major depressive disorder in young adults. *PLoS ONE*. 9: e96869, 2004.

Heils A, Mossner R, Lesch KP. The human serotonin transporter gene polymorphism-basic research and clinical implications. *J Neural Transm*. 104: 1005-14, 1997.

Heninger GR, Charney DS. Mechanism of action of antidepressant treatment: implications for the etiology and treatment of depressive disorders. En: MeltzerHY, ed. *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. New York: Raven Press; p.535-43, 1987.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*. 274: 2163–80, 2007.

Hercher C, Turecki G, Mechawar N. Through the looking glass: examining neuroanatomical evidence for cellular alterations in major depression. *J Psychiatr Res*. 43: 947-61, 2009.

Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase,

and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res.* 38: 247–52. 2007.

Herman JP, Cullinan We. Neurocircuitry of stress. Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20: 78-84, 1997.

Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 22: 1442–1454, 2012.

Holsboer F, Ising M. Central CRH system in depression and anxiety – evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 583: 350-7, 2008.

Holsen LM, Lancaster K, Klibanski A, Whitfield-Gabrieli S, Cherkerzian S, Buka S, Goldstein JM. HPA-Axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression. *Neuroscience.* 250: 733–742, 2013.

Horowitz MA, Wertz J, Zhu D, Cattaneo A, Musaelyan K, Nikkheslat N, Thuret S, Pariante CM, Zunszain PA. Antidepressant compounds can be both pro- and anti-inflammatory in human hippocampal cells. *Int J Neuropsychopharmacol.* 31:18, 2014.

Hrdina PD, Demeter E, Vu TB, Sotonyi P, Palkovits M. 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in brain of antidepressant-free suicide victims/depressives: increase in 5-HT<sub>2</sub> sites in cortex and amygdala. *Brain Res.* 614: 37-44, 1993.

Hroudova J, Fisar Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett.* 31: 336–342, 2010.

- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization – new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*. 11: 56–64, 2015.
- Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: comparison between milnacipran and paroxetine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33: 1451–3, 2009.
- Inoue K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci*. 65: 3074–3080, 2008.
- Irwin MR, Miller AH. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*. 21: 374–83, 2007.
- Ising M, S. Horstmann, S. Kloiber, Lucae S, Binder EB, Kern N, Kunzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F. Combined dexamethasone/ corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression-a potential biomarker? *Biological Psychiatry*. 62: 47–54, 2007.
- Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun*. 31: 105–114, 2013.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology*. 120: 190–9, 2001.
- Jazayeri S, Keshavarz SA, Tehrani-Doost M, Djalali M, Hosseini M, Amini H, Chamari M, Djazayeri A. Effects of eicosapentaenoic acid and fluoxetine on plasma cortisol, serum interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 concentrations in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res*. 178: 112–5, 2010.

- Jha, S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, Chen VS, Gris D, Matsushima GK, Ting JP. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci.* 30: 15811–15820, 2010.
- Jiang C, Salton SR. The role of neurotrophins in major depressive disorder. *Transl Neurosci.* 4: 46–58, 2013.
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy GJ, Aubry M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research.* 109: 143–148, 2002.
- Karunakaran U, Park KG. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes Metab J.* 37: 106–12, 2013.
- Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Grasso D, Lipschitz D, Houshyar S, Krystal JH, Gelernter J. Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol Psychiatry.* 59: 673-80, 2006.
- Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Kulikova R, Oskoui M, Battista V, Koenigsberger DY, Pascual JM, Sano M, Hirano M, DiMauro S, Shungu DC, Mao X, De Vivo DC. Protean phenotypic features of the A3243G mitochondrial DNA mutation. *Arch Neurol.* 66:85–91, 2009.
- Kenis G, Maes M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int J Neuropsychopharmacol.* 5: 401–412, 2002.
- Kendell SF, Krystal JH, Sanacora G. GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. *Expert Opin Ther Targets.* 9: 153-68, 2005.

Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. *Arch Gen Psychiatry*. 56: 322-7, 1999.

Kendler KS, Neale MC, Sullivan P, Corey LA, Gardner CO, Prescott CA. A population-based twin study in women of smoking initiation and nicotine dependence. *Psychological Medicine*. 29: 299-308, 1999.

Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *Am J Psychiatry*. 159: 1133-45, 2002.

Kendler KS, Kuhn JW, Prescott CA. Childhood sexual abuse, stressful life events and risk for major depression in women. *Psychological Medicine*. 34: 1475-82, 2004.

Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B. The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry*. 62: 529-35, 2005.

Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL. A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry*. 163: 109-14, 2006.

Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. *Am J Psychiatry*. 163: 115-24, 2006.

Kenis G, Maes M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int J Neuropsychopharmacol*. 5: 401-12, 2002.

Kennet GA, Chaouloff F, Marcou M, Curzon G- Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: The possible role of serotonin. *Brain Res*. 382: 416-421, 1986.

Kennet GA, Dourish CT, Curzon G. Antidepressant-like action of 5-HT<sub>1A</sub> agonists and conventional antidepressant in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol.* 134: 265-274, 1987.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 91: 461–553, 2011.

Khanzode SD, Dakhale GN, Khanzode SS, Saoji A, Palasodkar R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep.* 8: 365–70, 2003.

Kim YK, Won SD, Hur JW, Lee BH, Lee HY, Shim SH, Han SW, Choi SH. Exploration of biological markers of suicidal behavior in major depressive disorder. *Psychiatry Investigation.* 4: 13–21, 2007.

Kim MY, Lee JW, Kang HC, Kim E, Lee DC. Leukocyte mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with depression in old women. *Arch Gerontol Geriatr.* 53: e218–e221, 2011.

Knapp M. Hidden costs of mental illness. *Br J Psychiatry.* 183: 477-8, 2003.

Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macásek J, Stanková B, Tvrzická E, Zák A. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem.* 42: 1368–74, 2009.

Koene S, Kozicz TL, Rodenburg RJ, Verhaak CM, de Vries MC, Wortmann S, van de Heuvel L, Smeitink JA, Morava E. Major depression in adolescent children consecutively diagnosed with mitochondrial disorder. *J Affect Disord.* 114: 327–32, 2009.

Kokai M, Kashiwamura S, Okamura H, Ohara K, Morita, Y. Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders. *J Immunother.* 25: 68–71, 2002.

Kompagne H, Bárdos G, Szénási G, Gacsályi I, Hársing LG, Lévy G. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res.* 193: 311-4, 2008.

Koo JW, Duman RS. IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 105: 751–756, 2008.

Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor- $\kappa$ B is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 2669–2674, 2010.

Koolschijn PC, van Haren NE, Lensvelt-Mulders GJ, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a metaanalysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp.* 30: 3719-35, 2009.

Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry.* 19: 699–709, 2014.

Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci.* 7:121–147, 2011.

Krishnan R, Cella D, Leonardi C, Papp K, Gottlieb AB, Dunn M, Chiou CF, Patel V, Jahreis A. Effects of etanercept therapy on fatigue and symptoms of depression in subjects treated for moderate to severe plaque psoriasis for up to 96 weeks. *Br J Dermatol.* 157: 1275–7, 2007.

Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem- Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry.* 19: 699–709, 2014.



- Krsiak M, Sulcova A. Differential effects of six structurally related benzodiazepines on some ethological measures of timidity, aggression and locomotion in mice. *Psychopharmacology*. 101: 396-402, 1990.
- Kruijshaar ME, Barendregt J, Vos T, de GR, Spijker J, Andrews G. Lifetime prevalence estimates of major depression: an indirect estimation method and a quantification of recall bias. *Eur J Epidemiol*. 20:103–111, 2005.
- Kuehl Jr FA, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science*. 210:978–84, 1980.
- Lang UE, M. Bajbouj, J. Gallinat, and R. Hellweg. Brain derived neurotrophic factor serum concentrations in depressive patients during vagus nerve stimulation and repetitive transcranial magnetic stimulation. *Psychopharmacology*. 187: 56–59, 2006.
- Lapin JP, Oxenkrug GF. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet*. 132-6, 1969.
- Lee HJ, Rao JS, Ertley RN, Chang L, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine increases cytosolic phospholipase A(2) activity and arachidonic acid turnover in brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 190: 103–15, 2007.
- Lee HJ, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Kim HW. Chronic imipramine but not bupropion increases arachidonic acid signaling in rat brain: is this related to ‘switching’ in bipolar disorder? *Mol Psychiatry*. 15: 602–14, 2010.
- Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investigation*. 7: 231–235, 2010.

- Lee RS, Hermens DF, Porter MA, Redoblado-Hodge MA. A meta-analysis of cognitive deficits in first-episode major depressive disorder. *J Affect Disord.* 140: 113-24, 2012.
- Lee, S. Lim W, Kim SY, Chung JW, Kim J, Myung W, Song J, Kim S, Carroll BJ, Kim DK. Association between the BDNF Val66Met polymorphism and chronicity of depression. *Psychiatry Investigation.* 10: 56–61, 2013.
- Lee JY, Kang SR, Yune TY. Fluoxetine prevents oligodendrocyte cell death by inhibiting microglia activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 32: 633-44, 2015.
- Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol Rev.* 243: 152–162, 2011.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 274: 1527-31, 1996.
- Levine J, Rapaport A, Lev L, Bersudsky Y, Kofman O, Belmaker RH, Shapiro J, Agam G. Inositol treatment raises CSF inositol levels. *Brain Res.* 627: 168–70, 1993.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269: 970–3, 1995.
- Lewis CM, Ng MY, Butler AW, Cohen-Woods S, Uher R, Pirlo K, Weale ME, Schosser A, Paredes UM, Rivera M, Craddock N, Owen MJ, Jones L, Jones I, Korszun A, Aitchison KJ, Shi J, Quinn JP, Mackenzie A, Vollenweider P, Waeber G, Heath S, Lathrop M, Muglia P, Barnes MR, Whittaker JC, Tozzi F, Holsboer

- F, Preisig M, Farmer AE, Breen G, Craig IW, McGuffin P. Genome-Wide Association Study of Major Recurrent Depression in the UK Population. *Am J Psychiatry*.167: 949-57, 2010.
- Li Y, Couch L, Higuchi M, Fang JL, Guo L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. *Toxicol. Sci.* 127: 582–591, 2012.
- Liang TJ, Ghany MG. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 368:1907–17, 2013.
- Limone P, Biglino A, Bottino F, Forno B, Calvelli P, Fassino S, Berardi C, Ajmone-Catt P, Bertagna A, Tarocco RP, Rovera GG, Molinatti GM. Evidence for a positive correlation between serum cortisol levels and IL-1beta production by peripheral mononuclear cells in anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest*. 23: 422–427, 2000.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. fragmin during instability in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 343: 1139–47, 2000.
- Littarru GP, Tiano, L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. *Nutrition*. 26: 250-4, 2010.
- Liu J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res*. 33: 194–203, 2008.
- Liu Y, Ho RC-M, Mak A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J Affect Disord*. 139:230–9, 2012.

- Liu W, Zhou C. Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depressionlike rodents regardless of exercise preconditioning. *Psychoneuroendocrinology*. 37: 1057–1070, 2012.
- Liu Y, Ho RC, Mak A. The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 15: 183–7, 2012.
- Looney JM, Childs HM. The lactic acid and glutathione content of the blood of schizophrenic patients. *J Clin Invest*. 13: 963–8, 1934.
- López JJ, editor. Libro blanco. Estudio socioeconómico sobre el coste social de los trastornos de salud mental en España. Madrid: Gabinete de Estudios Sociológicos Bernard Krief, 1998.
- López-Armada MJ, Caramés B, Martín MA, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial activity is modulated by TNF alpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells .*Osteoarthritis Cartilage*. 14: 1011–1022, 2006.
- Lopez-Munoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des*. 15: 1563–86, 2009.
- Lu B, Wang C, Wang M, Li W, Chen F, Tracey KJ, Wang H. Molecular mechanism and therapeutic modulation of high mobility group box 1 release and action: an updated review. *Expt Rev Clin Immunol*. 10: 713–727, 2004.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernández AP, Rodrigo J, Boscá L, Leza JC. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 28: 1579–88, 2003.

Maes M, Bosmans E, Meltzer HY, Scharpe S, Suy E. Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psychiatry*. 150: 1189–1193, 1993.

Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, et al. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disord*. 34: 301–9, 1995b.

Maes M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*. 19: 11–38, 1995.

Maes M, Christophe A, Delanghe J, Altamura C, Neels H, Meltzer HY. Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res*. 85: 275–91, 1999.

Maes M, De Vos N, Pioli R, Demedts P, Wauters A, Neels H, Christophe A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. *J Affect Disord*. 58: 241–6, 2000.

Maes M, Mihaylova I, Leunis JC. Increased serum IgM antibodies directed against phosphatidyl inositol (Pi) in chronic fatigue syndrome (CFS) and major depression: evidence that an IgM-mediated immune response against Pi is one factor underpinning the comorbidity between both CFS and depression. *Neuro Endocrinol Lett*. 28: 861–7, 2007.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Leunis JC. An IgM-mediated immune response directed against nitro-bovine serum albumin (nitro-BSA) in chronic fatigue syndrome (CFS) and major depression: evidence that nitrosative stress is another factor underpinning the comorbidity between major depression and CFS. *Neuro Endocrinol Lett*. 29: 313–9, 2008a.

Maes M, Kubera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinalmucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negativeenterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology ofdepression. *Neuro Endocrinol Lett.* 29: 117–24, 2008b.

Maes M1, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Lower plasma Coenzyme Q10 in depression: a marker for treatment resistance and chronic fatigue in depression and a risk factor to cardiovascular disorder in that illness. *Neuro Endocrinol Lett.* 30: 462-9, 2009.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. CoenzymeQ10 deficiency in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is related to fatigue, autonomic and neurocognitive symptoms and is another riskfactor explaining the early mortality in ME/CFS due to cardiovascular disorder. *Neuro Endocrinol Lett.* 30: 470–6, 2009a.

Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis.* 24: 27–53, 2009a.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, amarker of oxidative damage to DNA, in major depressionand myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome. *Neuro Endocrinol Lett.* 30: 715–22, 2009b.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Lower plasmaCoenzyme Q10 in depression: a marker for treatment resistance and chronicfatigue in depression and a risk factor to cardiovascular disorder in that illness. *Neuro Endocrinol Lett.* 30: 462–9, 2009c.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: Markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord.* 125:287-94, 2010a.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Lower whole blood glutathione peroxidase (GPX) activity in depression, but not in myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome: lower GPX activity as another pathway explaining the increased incidence of coronary artery disease in depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:133-40, 2010b.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35: 676-92, 2011.

MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT, Fahnestock M.. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci.* 115: 1145–1153, 2001.

Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 69: 83-8, 1995.

Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev.* 38: 173–192, 2014.

- Maier SF, Watkins LR, Fleshner M. Psychoneuroimmunology. The interface between behavior, brain, and immunity. *Am Psychol.* 49: 1004–1017, 1994.
- Maiorino C, Khorrooshi R, Ruffini F, Løbner M, Bergami A, Garzetti L, Martino G, Owens T, Furlan R. Lentiviral-mediated administration of IL-25 in the CNS induces alternative activation of microglia. *Gene Ther.* 20: 487–496, 2013.
- Mancuso M, Filosto M, Bellan M, Liguori R, Montagna P, Baruzzi A, DiMauro S, Carelli V. POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness. *Neurology.* 62: 316–318, 2004.
- Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmune mechanisms of atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol.* 170: 723–43, 2005.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 13: 293–307, 2012.
- Mariappan N, Elks CM, Fink B, Francis J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 46: 462–470, 2009.
- Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: the importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis.* 54: 239–251, 2013.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1 $\beta$  promotes repair of the CNS. *J Neurosci.* 21: 7046–7052, 2001.
- Mason DR, Beck PL, Muruve DA, 2012. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and inflammasomes in the pathogenesis of nonmicrobial inflammation and diseases. *J Innate Immun.* 4: 16–30, 2012.



McElroy SL, Keck PE. Obesity in bipolar disorder: an overview. *Curr Psychiatry Rep.* 14: 650–8, 2012.

McFarquhar M, Elliott R, McKie S, Thomas E, Downey D, Mekli K, Toth ZG, Anderson IM, Deakin JF, Juhasz G. TOMM40 rs2075650 may represent a new candidate gene for vulnerability to major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology.* 39: 1743–1753, 2014.

McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 28: 639–47, 2007.

McIntyre DC, Kent P, Hayley S, Merali Z, Anisman H. Influence of psychogenic and neurogenic stressors on neuroendocrine and central monoamine activity in fast and slow kindling rats. *Brain Res.* 840: 65-74, 1999.

McQuade R, Young AH. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. *Br J Psychiatry.* 177: 390–5, 2000.

Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol.* 166: 1-15, 2011.

Menu P, Mayor A, Zhou R, Tardivel A, Ichijo H, Mori K, Tschopp J. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis.* 3, e261, 2012.

Merikangas KR, He JP, Brody D, Fisher PW, Bourdon K, Koretz DS. Prevalence and treatment of mental disorders among US children in the 2001–2004 NHANES. *Pediatrics.* 125:75–81, 2010.

Michel TM, Frangou S, Thiemeyer D, Camara S, Jecel J, Nara K, Brunklaus A, Zoechling R, Riederer P. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiatry Res.* 151: 145–50, 2007.

Michel TM, Camara S, Tatschner T, Frangou S, Sheldrick AJ, Riederer P, Grünblatt E. Increased xanthine oxidase in the thalamus and putamen in depression. *World J Biol Psychiatry*. 12: 1–7, 2008.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 65: 732–41, 2009.

Miller AH, Haroon E, Raison CL, Felger JC. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety*. 30: 297–306, 2013.

Moore CM, Christensen JD, Lafer B, FavaM, Renshaw PF. Lower levels of nucleoside triphosphate in the basal ganglia of depressed subjects: a phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Psychiatry*. 154: 116–118, 1997.

Moreno-Fernández AM, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Alcocer-Gómez E, Casas-Barquero N, Carmona-López MI, Sánchez-Alcázar JA, de Miguel M. Oral treatment with amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative stress in psychiatric patients. *J Psychiatr Res*. 46: 341–345, 2012.

Morriss R, Mohammed FA. Metabolism, lifestyle and bipolar affective disorder. *J Psychopharmacol*. 19: 94–101, 2005.

Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Müller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Möller HJ, Arolt V, Riedel M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry*. 11: 680–4, 2006.

Munafo MR, Durrant C, Lewis G, Flint J. Gene X environment interactions at the serotonin transporter locus. *Biol Psychiatry*. 65: 211–9, 2009.

- Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 57:525–532, 2005.
- Munakata K, Fujii K, Nanko S, Kunugi H, Kato T. Sequence and functional analyses of mtDNA in a maternally inherited family with bipolar disorder and depression. *Mutat Res*. 617: 119–124, 2007.
- Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 349: 1498-504, 1997.
- Naik E, Dixit V.M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*. 208: 417-20, 2011.
- Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation* .10:43, 2013.
- Najjar S, Pearlman DM. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophrenia*. 161: 102–112, 2015.
- Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals*. 7: 1028–1048, 2014.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin- releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*. 226: 1342-4, 1984.
- Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*. 1: 336-42, 1996.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 15: 7539–7547, 1995.

- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314–1318, 2005.
- Nutt DJ. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry*. 67: 3-8, 2006.
- O'Brien SM, Scully P, Fitzgerald P, Scott LV, Dinan TG. Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy. *J Psychiatr Res*. 41: 326–331, 2007.
- Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Review. Cell*. 126:659-62, 2006.
- Oliveira RM, Guimarães FS, Deakin JF. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res*. 41: 333–41, 2008.
- Oliveira M, Pillat M, Cheffer A, Lameu C, Schwindt TT, Ulrich H. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. *Cytometry A*. 83: 76–89, 2013.
- Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A, Sparen P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 58: 844–50, 2001.
- Ouyang X, Ghani A, Malik A, Wilder T, Colegio OR, Flavell RA, Cronstein BN, Mehal WZ. Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A2A receptor and the HIF-1 $\alpha$  pathway. *Nat Commun*. 4: 2909, 2013.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*. 19:89–95, 2004.
- Pace TW, Miller AH. Cytokines and glucocorticoid receptor signaling. relevance to major depression. *Ann N Y Acad Sci*. 1179: 86–105, 2009.

- Pae CU, Yoon SJ, Patkar A, Kim JJ, Jun TY, Lee C, Paik IH. Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism and mood disorders: a preliminary study. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*. 30: 1326–9, 2006.
- Pagura J, Fotti S, Katz L Y, Sareen, J. Help seeking and perceived need for mental health care among individuals in Canada with suicidal behaviors. *Psychiatric Services*. 60: 943–949, 2009.
- Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun*. S0889–1591: 00120–00122, 2014.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Zhang H, Pavuluri MN. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34: 645–651, 2010.
- Patel A. Review: the role of inflammation in depression. *Psychiatr Danub*. 25 Suppl 2: 216-23, 2013.
- Pavlovsky AA, Boehning D, Li D, Zhang Y, Fan X, Green TA. Psychological stress, cocaine and natural reward each induce endoplasmic reticulum stress genes in rat brain. *Neuroscience*. 246: 160–169, 2013.
- Pinto VL, Brunini TM, Ferraz MR, Okinga A, Mendes-Ribeiro AC. Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxide. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 6: 142–9, 2008.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 229: 327-336, 1977a.
- Porsolt, RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266: 730-732, 1977b.

- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47: 379-391, 1978.
- Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, Camp RM, Gabella KM, Johnson JD. Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neuroscience.* 188: 48-54, 2011.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology.* 60: 436-44, 1994.
- Raedler TJ. Inflammatory mechanisms in major depressive disorder. *Curr Opin. Psychiatry.* 24: 519-525, 2011.
- Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry.* 160: 1554-65, 2003.
- Raison CL, Broadwell SD, Borisov AS, Manatunga AK, Capuron L, Woolwine BJ, Jacobson IM, Nemeroff CB, Miller AH. Depressive symptoms and viral clearance in patients receiving interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C. *Brain Behav Immun.* 19: 23-7, 2005.
- Raison CL, Miller AH. Is depression an inflammatory disorder? *Curr Psychiatry Rep.* 13: 467-475, 2011.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 27: 24-31, 2012.
- Raison CL, Miller AH. Malaise, melancholia and madness: the evolutionary legacy of an inflammatory bias. *Brain Behav Immun.* 31: 1-8. 2013.

- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev.* 30: 77–105, 1999.
- Ramirez K, Shea DT, McKim DB, Reader BF, Sheridan JF. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. *Brain Behav Immun.* 46: 212-20, 2015.
- Rao NP, Venkatasubramanian G, Ravi V, Kalmady S, Cherian A, Yc JR. Plasma cytokine abnormalities in drug-naïve, comorbidity-free obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 229: 949-52, 2015.
- Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 122: 1164–1171, 2012.
- Rawdin BS, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y, Burke HM, Reus VI, Rosser R, Hamilton SP, Nelson JC, Wolkowitz OM. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun.* S0889-1591: 00497-7, 2012.
- Renshaw PF, Parow AM, Hirashima F, Ke Y, Moore CM, Frederick B de B, Fava M, Hennen J, Cohen BM. Multinuclear magnetic resonance spectroscopy studies of brain purines in major depression. *Am J Psychiatry.* 158: 2048–2055, 2001.
- Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience.* 300: 141-54, 2015.
- Reus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV, Macêdo DS, Quevedo J. Minocycline protects against oxidative damage and

alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Met Brain Dis.*30: 545–553, 2015b.

Réus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* 68: 316-28, 2015.

Rezin GT, Cardoso MR, Goncalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int.* 53: 395–400, 2008.

Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res.* 34: 1021–1029, 2009.

Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA.* 301: 2462-71, 2009.

Rigucci S, Serafini G, Pompili M, Kotzalidis GD, Tatarelli R. Anatomical and functional correlates in major depressive disorder: the contribution of neuroimaging studies. *World J Biol Psychiatry.* 11: 165–180, 2010.

Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP. Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS ONE.* 4: e4913, 2009.



- Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 53: 23-34, 2014.
- Rush AJ, Giles DE, Schlessler MA, Orsulak PJ, Parker CR Jr, Weissenburger JE, Crowley GT, Khatami M, Vasavada N. The dexamethasone suppression test in patients with mood disorders. *J Clin Psychiatry*. 57: 470–484, 1996.
- Sabunciyan S, Kirches E, Krause G, Bogerts B, Mawrin C, Llenos I, Weis S.. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm*. 114: 665–674, 2007a.
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol*. 22: 67–73, 2007.
- Sato E, Nishimura K, Nakajima A, Okamoto H, Shinozaki M, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Major depressive disorder in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 23: 237–44, 2013.
- Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29: 201–217, 2005.
- Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 122: 509-22, 1965.
- Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*. 36: 2375–2394, 2011.

Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care*. 16:136, 2012.

Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord*. 107: 89–94, 2008.

Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci*. 78: 2088–98, 2006.

Serres F, Azorin JM, Valli M, Jeanningros R. Evidence for an increase in functional platelet 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depressed patients using the new ligand [125I]-DOI. *Eur Psychiatry*. 14: 451-7, 1999.

Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med*. 40: 281–295, 2008.

Sharma BB, Singh S, Sharma VK, Choudhary M, Singh V, Lane S, et al. Psychiatric morbidity in chronic respiratory disorders in an Indian service using GMHAT/PC. *Gen Hosp Psychiatry*. 35: 39–44, 2013.

Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Reddy R, Aschner M, Lewis DA, Mirnics K. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry*. 16: 751–762, 2011.

Shelton RC, Miller AH. Inflammation in depression: is adiposity a cause? *Dialogues Clin Neurosci*. 41–53, 2011.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang

Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*. 36: 401-14, 2012.

Shimoda-Matsubayashi S, Hattori T, Matsumine H. MnSOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control. *Neurology*. 49: 1257-61, 1997.

Sen S, Karg K, Burmeister M. The Serotonin Transporter Promoter Variant (5-HTTLPR), Stress, and Depression Meta-Analysis Revisited: Evidence of Genetic Moderation. *Biological Psychiatry*. 67: 676, 2010.

Serretti A, Artioli P. The pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacogenomics J*. 4: 233-44, 2004.

Shaw PX. Rethinking oxidized low-density lipoprotein, its role in atherogenesis and the immune responses associated with it. *Arch Immunol Therap Exp*. 52: 225-39, 2004.

Sher L, Oquendo MA, Burke AK, Cooper TB, John Mann J. Combined dexamethasone suppression-corticotrophin-releasing hormone stimulation test in medication-free major depression and healthy volunteers. *Journal of Affective Disorders*. 151:1108-12, 2013.

Shi J, Potash JB, Knowles JA, Weissman MM, Coryell W, Scheftner WA, Lawson WB, DePaulo JR Jr, Gejman PV, Sanders AR, Johnson JK, Adams P, Chaudhury S, Jancic D, Evgrafov O, Zvinyatskovskiy A, Ertman N, Gladis M, Neimanas K, Goodell M, Hale N, Ney N, Verma R, Mirel D, Holmans P, Levinson DF. Genome-wide association study of recurrent early-onset major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 16: 193-201, 2011.

- Silveira P, Xavier M, Souza F, Manoli L, Rosat R, Ferreira M, Dalmaz, C. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 1343–1350, 2000.
- Silverman MN, Miller AH, Biron CA, Pearce BD. Characterization of an interleukin-6- and adrenocorticotropin-dependent, immune-to-adrenal pathway during viral infection. *Endocrinology*. 145: 3580–9, 2004.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 15: 1768–1777, 1995.
- Smits BW, Fermont J, Delnooz CC, Kalkman JS, Bleijenberg G, van Engelen BG. Disease impact in chronic progressive external ophthalmoplegia: more than meets the eye. *Neuromuscul Disord*. 21: 272–278, 2011.
- Snyder HR. Major depressive disorder is associated with broad impairments on neuropsychological measures of executive function: a meta-analysis and review. *Psychol Bull*. 139: 81-132, 2013.
- Sobocki P, Jonsson B, Angst J, Rehnberg C. Cost of depression in Europe. *J Ment Health Policy Econ*. 9: 87-98, 2006.
- Soczynska JK, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, Liauw SS, Alsuwaidan M, Yim CY, McIntyre RS. Mood disorders and obesity: understanding inflammation as a pathophysiological nexus. *Neuromolecular Med*. 13: 93–116, 2011.
- Soczynska JK, Mansur RB, Brietzke E, Swardfager W, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, Powell AM, Manierka MS, McIntyre RS. Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. *Behav Brain Res*. 235:302–317, 2012.

- Song C, Killeen AA, Leonard BE. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in neutrophils of sham-operated and olfactory-bulbectomised rats following chronic treatment with desipramine and lithium chloride. *Neuropsychobiology*. 30: 24–8, 1994.
- Song C, Horrobin DF, Leonard BE. The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. *Pharmacopsychiatry*. 39: 88–99, 2006.
- Song C, Halbreich U, Han C, Leonard BE, Luo H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry*. 42: 182–188, 2009.
- Stahl S. 5HT1A receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull*. 30: 39-43, 1994.
- Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285:433–7, 2003.
- Stephens A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 21: 901–12, 2007.
- Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 26: 19–26, 2013.

- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky, Peddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience*. 131: 43–54, 2005.
- Strakowski SM, DelBello MP, Adler C, Cecil DM, Sax KW. Neuroimaging in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2: 148–164, 2000.
- Strike PC, Wardle J, Steptoe A. Mild acute inflammatory stimulation induces transient negative mood. *J Psychosom Res*. 57: 189–94, 2004.
- Ströhle A, Holsboer F. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry*. 36: 207–214, 2003.
- Sugama S, Fujita M, Hashimoto M, Conti B. Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience*. 146:1388–1399, 2007.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*. 157: 1552–62, 2000.
- Sulser F, Vetulani J, Mobley PL. Mode of action of antidepressant drugs. *Biochem Pharmacol*. 27: 257–61, 1978.
- Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lönnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest*. 90: 61–66, 1992.
- Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszeń M. Accelerated

apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32: 686–94, 2008.

Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, Sato K. L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the ‘collusion’ hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 9: 275, 2012.

Thase ME. Preventing relapse and recurrence of depression: a brief review of therapeutic options. *CNS Spectr*. 11: 12–21, 2006.

Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M, Nakai Y, Hirai Y, Imura H. Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology*. 128: 526–531, 1991.

Torrell H, Montana E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 162B: 213–223, 2013.

Tripp H, Oh JP, Guilloux K, Martinowich DA, Lewis, Sibille E. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*. 169: 1194–1202, 2012.

Turconi AC, Benti R, Castelli E, Pochintesta S, Felisari G, Comi G, Gagliardi C, Del Piccolo L, Bresolin N. Focal cognitive impairment in mitochondrial encephalomyopathies: a neuropsychological and neuroimaging study. *J Neurol Sci*. 170: 57–63, 1999.

- Turrens, JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552: 335-44, 2003.
- Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta.* 1660: 71-99, 2004.
- Tyring S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, Lalla D, Woolley M, Jahreis A, Zitnik R, Cella D, Krishnan R. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet.* 367: 29–35, 2006.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 27: 120–39, 2009.
- Van Goethem G, Lofgren A, Dermaut B, Ceuterick C, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle. *Hum Mutat.* 22: 175–176, 2003.
- Van Lieshout RJ, Macqueen GM. Relations between asthma and psychological distress: an old idea revisited. *Chem Immunol Allergy.* 98: 1–13, 2012.
- Van Os J, Kenis G, Rutten BPF. The environment and schizophrenia. *Nature.* 468: 203-12, 2010.
- Van Praag HM. Monoaminas y depresión: una visión retrospectiva. López-Muñoz F, Alamo C, editores. *Historia de la Psicofarmacología.* Madrid: Médica Panamericana; 517-44, 2006.
- Vázquez C, Sanz J. Fiabilidad y validez factorial de la versión española del inventario de depresión de Beck. Barcelona: III Congreso de Evaluación Psicológica, 1991.



- Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol.* 82: 57–71, 2007.
- Videbech P. PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatr Scand.* 101: 11–20, 2000.
- Villanueva R. Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast.* 2013: 873278, 2013.
- Vismari L, Alves GJ, Muscará MN, Palermo-Neto J. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34, 578–585, 2012.
- Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant and anxiolytic like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1 (2-trifluoromethylphenyl) imidazole in mice. *Behav Brain Res.* 140: 141–7, 2003.
- Volz HP, Rzanny R, Riehemann S, May S, Hegewald H, Preussler B, Hübner G, Kaiser WA, Sauer H. <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in the frontal lobe of major depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 248: 289–295, 1998.
- Walker EA, Roy-Byrne PP, Katon WJ, Li L, Amos D, Jiranek G. Psychiatric illness and irritable bowel syndrome: a comparison with inflammatory bowel disease. *Am J Psychiatry.* 147: 1656–61, 1990.
- Walker JR, Graff LA, Dutz JP, Bernstein CN. Psychiatric disorders in patients with immune-mediated inflammatory diseases: prevalence, association with disease activity, and overall patient well-being. *J Rheumatol Suppl.* 88: 31–5, 2011.

- Wang D, An SC, Zhang X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett.* 433: 59–64, 2008.
- Watanabe Y, Gould E, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS. Phenytoin prevents stress and corticosterone induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus.* 2: 431–435, 1992a.
- Watanabe Y, Gould E, Daniels DC, Cameron H, McEwen BS. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 222: 157–162, 1992b.
- Watkins CC, Sawa A, Pomper MG. Glia and immune cell signaling in bipolar disorder: insights from neuropharmacology and molecular imaging to clinical application. *Transl Psychiatry.* 4: e350, 2014.
- Watson S, P. Mackin. HPA axis function in mood disorders. *Psychiatry.* 5: 166–170, 2006.
- Wei YC, Zhou FL, He DL, Bai JR, Hui LY, Wang XY, Nan KJ.. The level of oxidative stress and the expression of genes involved in DNA-damage signaling pathways in depressive patients with colorectal carcinoma. *J Psychosom Res.* 66: 259–66, 2009.
- Weigle N, McBane S. Psoriasis. *Am Fam Physician.* 87: 626–33, 2013.
- WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. Cross-National comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Bull World Health Organ.* 78: 413–26, 2000.
- Wichers M, Kenis G, Jacobs N, Mengelers R, Derom C, Vlietinck R, van Os J. The BDNF Val(66)Met x 5-HTTLPR x child adversity interaction and depressive

symptoms: An attempt at replication. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B: 120-3, 2008.

Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 5: 36–44, 2014.

Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neuroscience.* 8: 1069–1077, 2005.

Wright CE, Strike PC, Brydon L, Steptoe A. Acute inflammation and negative mood: mediation by cytokine activation. *Brain Behav Immun.* 19: 345–50, 2005.

Wu LL, Chiou CC, ChangPY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 339:1–9, 2004.

Young EA, Korszun A. The hypothalamic-pituitarygonadal axis in mood disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 31: 63–78, 2002.

Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 63: 856-64, 2006.

Zagrebelsky MA, Holz G, Dechant YA, Barde T, Bonhoeffer, Korte M. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience.* 25: 9989–9999, 2005.

Zhang J, Terreni L, De Simoni MG, Dunn AJ. Peripheral interleukin-6 administration increases extracellular concentrations of serotonin and the evoked release of serotonin in the rat striatum. *Neurochem Int.* 38: 303–8, 2001.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469: 221–225, 2011.

Zhou L, Xiong J, Lim Y, Ruan Y, Huang C, Zhu Y, Zhong JH, Xiao Z, Zhou XF. Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord*. 150: 776–784, 2013.

Zorrilla EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schmidt K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behave Immun*. 15: 199–226, 2001.

Zubenko GS, Maher B, Hughes HB, Zubenko WN, Stiffler JS, Kaplan BB, Marazita ML. Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 123B: 1-18, 2003.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, Thuret S, Price J, Pariante CM. Interleukin-1 $\beta$ : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 37: 939–949, 2012.

## 8. PRODUCCIÓN

Artículos derivados de la tesis:

1. **Alcocer-Gómez E**, Casas-Barquero N, Romero-Guillena SL, Williams MR, Cañadas-Lozano D, Bullón P, Sánchez-Alcazar JA, Cordero MD. **Differential effect of antidepressant treatment in the inhibition of NLRP3-inflammasome in Major depressive disorder**. Brain Behav Immun. 2015. Enviado
2. **Alcocer-Gómez E**, Ulecia-Morón C, Marín-Aguilar F, Rybkina T, Casas-Barquero N, Ruiz-Cabello J, Ryffel B, Apetoh L, Ghiringhelli F, Bullón P, Sánchez-Alcazar JA, Carrión AM, Cordero MD. **Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome**. Mol Neurobiol. 2015 Sep 11. In press
3. **Alcocer-Gómez E**, de Miguel M, Casas-Barquero N, Núñez-Vasco J, Sánchez-Alcazar JA, Fernández-Rodríguez A, Cordero MD. **NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder**. Brain Behav Immun. 2014;36:111-7.
4. **Alcocer-Gómez E**, Cordero MD. **NLRP3 inflammasome: a new target in major depressive disorder**. CNS Neurosci Ther. 2014;20(3):294-5.

Patente:

USO DE INDUCTORES DE AMPK Y METFORMINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROMIALGIA. Mario David Cordero Morales, Pedro Bullón Fernández, Elisabet Alcocer Gómez. P201400296.

Congresos:

**Autores:** Nieves Casas-Barquero, Samuel L. Romero-Guillena, **Elisabet Alcocer-Gómez**, Mario D. Cordero. **Título:** How does amitriptyline treatment affect coenzyme Q levels and oxidative stress in patients diagnosed with depressive disorder? **Congreso:** 25º ECNP Congress, 2012 **Lugar celebración:** Vienna, Austria. 2012

**Autores:** **Elisabet Alcocer Gómez**, Mario D. Cordero, Nieves Casas Barquero, Jéssica Núñez Vasco, Manuel de Miguel. **Título:** NLRP3 inflammasome activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Congreso:** XXXVI Congreso de la SEBBM. **Lugar celebración:** Madrid, España. 2013

**Autores:** Samuel L. Romero-Guillena, Nieves Casas-Barquero, **Elísabet Alcocer-Gómez**, Mario D. Cordero. **Título:** Inflammasome complex is implicated in the severity of major depressive disorder. **Congreso:** 27° ECNP Congress, 2014 **Lugar celebración:** Berlín, Alemania. 2014

**Autores:** Mario D. Cordero, **Elísabet Alcocer-Gómez**, Nieves Casas-Barquero, Samuel L. Romero-Guillena, Pedro Bullón, Angel M. Carrión. **Título:** Implication of coenzyme Q in mood disorder. **Congreso:** 27° ECNP Congress, 2014 **Lugar celebración:** Berlín, Alemania. 2014

**Autores:** **Elísabet Alcocer-Gómez**, Nieves Casas-Barquero, Fabiola Marín-Aguilar, Pedro Bullón, Angel M. Carrión, Jose A. Sanchez-Alcazar, Mario D. Cordero. **Título:** NLRP3-inflammasome complex is implicated in depressive behaviour induced by stress. **Congreso:** 28° ECNP Congress, 2015. **Lugar celebración:** Amsterdam, Holanda. 2015

**Autores:** Mario D. Cordero, **Elísabet Alcocer-Gómez**, Lourdes Román-Malo, Nieves Casas-Barquero, Pedro Bullón, Angel M. Carrión. **Título:** AMP-activated protein kinase is implicated in depressive behaviour. **Congreso:** 28° ECNP Congress, 2015 **Lugar celebración:** Amsterdam, Holanda. 2015

**ANEXOS**





# NLRP3 Inflammasome: A New Target in Major Depressive Disorder

Elísabet Alcocer-Gómez<sup>1</sup> & Mario D. Cordero<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Research Laboratory, Dental School, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

## Correspondence

M. D. Cordero, Research Laboratory, Dental School, Universidad de Sevilla, C/Avicena s/n, 41009 Sevilla, Spain.

Tel.: +34 954 481120;

Fax: +34 954 486784;

E-mail: mdcormor@us.es

Received 4 December 2013; revision 1

January 2014; accepted 6 January 2014

doi: 10.1111/cns.12230

Inflammasome has emerged recently as an unexpected sensor for metabolic danger and stress. Indeed, it has been implicated in the development of major diseases such as gout, type 2 diabetes, and obesity-induced insulin resistance and is increasingly suspected of playing a major role in other human pathologies such as cancer, asbestosis, and Alzheimer's disease [1]. The inflammasome is a protein complex that comprises an intracellular sensor, typically a Nod-like receptor (NLR), the precursor procaspase-1, and the adaptor ASC. Inflammasome activation leads to the maturation of caspase-1 and the processing of its substrates, IL-1 $\beta$ , and IL-18 [2]. Of all the NLRs, NLRP3 is activated by the most diverse array of danger signals.

Recently, it has been hypothesized the implication of inflammasome in depression and related comorbid systemic illnesses [3], however, was necessary to demonstrate the activation of NLRP3 inflammasome in depressive patients. This event was intuited because IL-1 $\beta$ , one of the two known cytokines activated by the inflammasome complex, has been implicated in stress, depression, and central nervous system (CNS) dysregulation [3]. A recent paper published in CNS Neuroscience and Therapeutics by Zhang et al. [4] have showed in first time that the NLRP3 inflammasome is involved in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. In parallel, the authors of the present paper have showed in first time the activation of NLRP3 inflammasome in blood mononuclear cells from depressive patients with a high correlation between IL-1 $\beta$  and IL-18 with Beck Depression Inventory scores of depressive patients [5]. These are two papers demonstrating in an animal model and patients, the hypothesis of Iwata et al. These findings provide new insight into the pathogenesis of major depressive disorder. Now, we must deepen about this and study several point involved in the pathogenesis of this disease.

## The Mechanism of Disease

Major depressive disorder is a severe and potentially debilitating psychiatric illness that is characterized by a significant change in mood accompanied by other symptoms such as low self-esteem, anhedonia, and disrupted sleeping, eating, and cognition. Despite the fact that it affects up to 10% of the general population worldwide, its pathogenic mechanism remains elusive. Consequently, research is now aimed at characterizing its pathophysiology at the cellular and molecular level.

The first question that we must respond is concerning to the events which induce the activation of inflammasome in this disease. Psychological stress as inductor of increased IL-1 $\beta$  serum levels has been proposed [3]; however, molecular mechanisms by which psychological stress could induce activation of inflammasome are unknown. Depression is a very common disease in the general population worldwide in which, together to environmental factors, it is clear that genetic factors are involved, so in addition to psychological stress, we have to look for endogenous events which induce inflammasome activation. It could be interesting to investigate the role of molecules involved in the pathophysiology of depression, which could have potential to induce NLRP3 inflammasome activation. Supporting this hypothesis, it has been showed that cortisol correlates with increased levels of IL-1 $\beta$  in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysregulation such as in anorexia nervosa [6]. Because hippocampus has an important role in the pathogenesis of depression, it will be interesting to analyze the implication and impact of NLRP3 inflammasome activation in the area of hippocampus and neurogenesis, two major changes in this disease known [7]. In agreement with these, it has been observed that IL-1 $\beta$  inhibits the differentiation of hippocampal neural precursor cells [8].

	C N S	1 2 3 0	WILEY	Dispatch: 18.1.14	CE: Sathya D.
	Journal Code	Manuscript No.		No. of pages: 2	PE: Sharmila

## Implications in the Treatment of Depression

The other important question is the implication of inflammasome in the treatment of depression. It has been found that antidepressant treatment reduces serum levels of IL-1 $\beta$ , but not TNF $\alpha$ , suggesting that IL-1 $\beta$  plays a major role in treatment response [9]. We have described that amitriptyline, a tricyclic antidepressant, reduce NLRP3 and caspase-1 gene expression, and IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels [5]. Other typical treatments of depression are monoamine neurotransmitters, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), and serotonin–noradrenalin reuptake inhibitors; however, the efficacy of these treatments remains uncertain showing significant limitations related to treatment-resistant depression. So, inflammasome could be a biomarker to evaluate the effectiveness and resistant to antidepressants. According to this hypothesis, it has been shown that the resistance to SSRI may be driven by the pathologically increased IL-1 $\beta$  [10].

## Genetics Implications

The major goals of personalized medicine are to predict an individual's susceptibility to developing an illness, achieve accurate diagnosis, and optimize the most efficient and favorable response to treatment. Mutations and polymorphisms in NLR-coding genes or in genetic loci encoding inflammasome-related proteins correlate with a variety of autoinflammatory diseases and propose susceptibility mechanism. In this case, several polymorphisms in the two

known cytokines activated by the inflammasome complex have shown increase the susceptibility to depression in response to stressful life events [11–13]. Therefore, the role of new polymorphisms in NLRP3 or other NLR-coding genes could be an interesting new way to evaluate susceptibility profile in depressive patients.

## Future Considerations

Personalized medicine holds the hope of increasing the likelihood that patients with depression will respond to treatment and achieve remission. In agreement with this, the NLRP3 inflammasome represents a possible and interesting sensor with potential to offer a personalized biomarker that help predict response to particular treatments. Furthermore, a dose-dependent screening with several drugs in cells from patients may provide profiles of the most indicated treatments in each case. Several studies have indicated discrepancies regarding the pathological role of inflammation in MDD. These discrepancies could be the result of the presence of subgroups of patients with different levels of psychological stress. Anyway, NLRP3 inflammasome offers a new perspective in the study of depression, in particular, and psychiatric diseases in general.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 2011;**166**:1–15.
- Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol Rev* 2011;**243**:152–162.
- Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun* 2013;**31**:105–114.
- Zhang Y, Liu L, Peng YL, et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther* 2013; **19**:1111–1117. doi: 10.1111/cns.12170
- Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 2013;**37**:100–107. doi: 10.1016/j.bbi.2013.10.017
- Limone P, Biglino A, Bottino F, et al. Evidence for a positive correlation between serum cortisol levels and IL-1 $\beta$  production by peripheral mononuclear cells in anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest* 2000;**23**:422–427.
- Tang SW, Helme D, Leonard B. Is neurogenesis relevant in depression and in the mechanism of antidepressant drug action? A critical review. *World J Biol Psychiatry* 2012;**13**:402–412.
- Zhang K, Xu H, Cao L, Li K, Huang Q. Interleukin-1 $\beta$  inhibits the differentiation of hippocampal neural precursor cells into serotonergic neurons. *Brain Res* 2013;**1490**:193–201.
- Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a metaanalysis. *Neuropsychopharmacology* 2011;**36**:2452–2459.
- Pineda EA, Hensler JG, Sankar R, Shin D, Burke TF, Mazarati AM. Interleukin-1 $\beta$  causes fluoxetine resistance in an animal model of epilepsy-associated depression. *Neurotherapeutics* 2012;**9**:477–485.
- Borkowska P, Kucia K, Rzeznicek S, et al. Interleukin-1 $\beta$  promoter (–31T/C and –511C/T) polymorphisms in major recurrent depression. *J Mol Neurosci* 2011;**44**:12–16.
- Haastrop E, Bukh JD, Bock C, et al. Promoter variants in IL18 are associated with onset of depression in patients previously exposed to stressful-life events. *J Affect Disord* 2012;**136**:134–138.
- Hwang JP, Tsai SJ, Hong CJ, Yang CH, Hsu CD, Liou YJ. Interleukin-1  $\beta$  –511C/T genetic polymorphism is associated with age of onset of geriatric depression. *Neuromolecular Med* 2009;**11**:322–327.

## Author Query Form

Journal: CNS  
Article: 12230

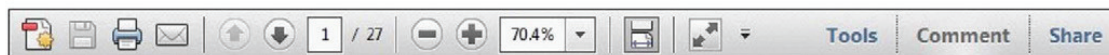
Dear Author,

During the copy-editing of your paper, the following queries arose. Please respond to these by marking up your proofs with the necessary changes/additions. Please write your answers on the query sheet if there is insufficient space on the page proofs. Please write clearly and follow the conventions shown on the attached corrections sheet. If returning the proof by fax do not write too close to the paper's edge. Please remember that illegible mark-ups may delay publication.

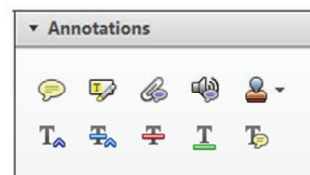
Many thanks for your assistance.

Query reference	Query	Remarks
1	AUTHOR: Please provide the volume number, page range for reference [4].	
2	AUTHOR: Please provide the volume number, page range for reference [5].	

Once you have Acrobat Reader open on your computer, click on the [Comment](#) tab at the right of the toolbar:



This will open up a panel down the right side of the document. The majority of tools you will use for annotating your proof will be in the [Annotations](#) section, pictured opposite. We've picked out some of these tools below:



### 1. [Replace \(Ins\)](#) Tool – for replacing text.

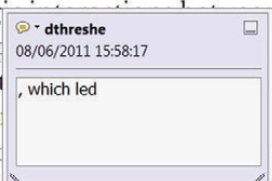


Strikes a line through text and opens up a text box where replacement text can be entered.

#### How to use it

- Highlight a word or sentence.
- Click on the [Replace \(Ins\)](#) icon in the Annotations section.
- Type the replacement text into the blue box that appears.

standard framework for the analysis of monetary policy. Nevertheless, it also led to exogenous shocks and a number of strategic responses. The number of competitors is that the structure of the main components of the model, at the level, are exogenous. Important works on this by Shiraiwa (1987) and henceforth. We open the black box



### 2. [Strikethrough \(Del\)](#) Tool – for deleting text.



Strikes a red line through text that is to be deleted.

#### How to use it

- Highlight a word or sentence.
- Click on the [Strikethrough \(Del\)](#) icon in the Annotations section.

there is no room for extra profits and mark-ups are zero and the number of (net) values are not determined by Blanchard and Kiyotaki (1987), perfect competition in general equilibrium of aggregate demand and supply in a classical framework assuming monopoly. An exogenous number of firms

### 3. [Add note to text](#) Tool – for highlighting a section to be changed to bold or italic.



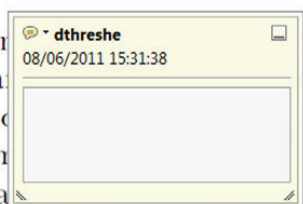
Highlights text in yellow and opens up a text box where comments can be entered.

#### How to use it

- Highlight the relevant section of text.
- Click on the [Add note to text](#) icon in the Annotations section.
- Type instruction on what should be changed regarding the text into the yellow box that appears.

dynamic responses of mark-ups consistent with the VAR evidence

sation of the model with bell-shaped demand curves. The number of competitors and the impact of a shock on the demand curve is that the structure of the sector



### 4. [Add sticky note](#) Tool – for making notes at specific points in the text.

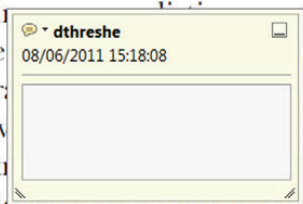


Marks a point in the proof where a comment needs to be highlighted.

#### How to use it

- Click on the [Add sticky note](#) icon in the Annotations section.
- Click at the point in the proof where the comment should be inserted.
- Type the comment into the yellow box that appears.

and supply shocks. Most of the administrative data on the number of firms in the standard framework. New evidence on the number of competitors and the impact of a shock on the demand curve is that the structure of the sector



**5. Attach File Tool – for inserting large amounts of text or replacement figures.**

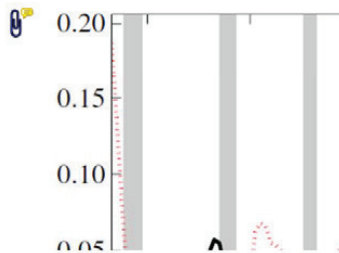


Inserts an icon linking to the attached file in the appropriate place in the text.

**How to use it**

- Click on the **Attach File** icon in the Annotations section.
- Click on the proof to where you'd like the attached file to be linked.
- Select the file to be attached from your computer or network.
- Select the colour and type of icon that will appear in the proof. Click OK.

END



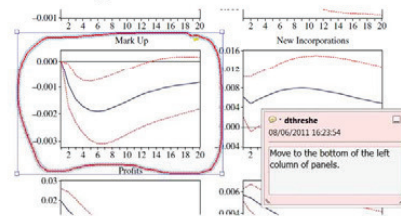
**6. Drawing Markups Tools – for drawing shapes, lines and freeform annotations on proofs and commenting on these marks.**

Allows shapes, lines and freeform annotations to be drawn on proofs and for comment to be made on these marks.

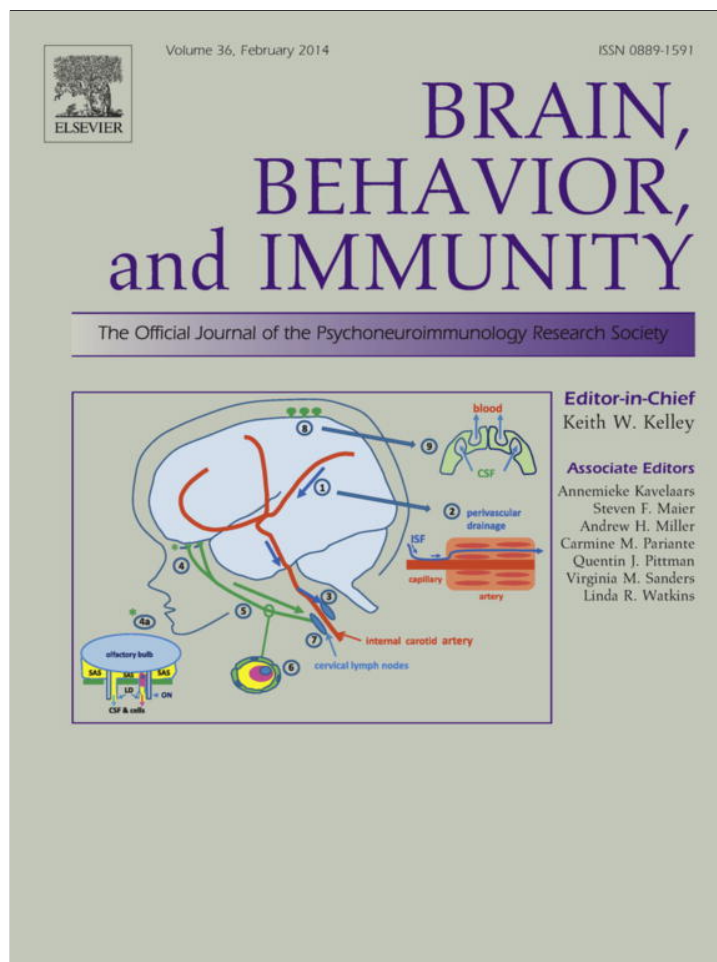


**How to use it**

- Click on one of the shapes in the Drawing Markups section.
- Click on the proof at the relevant point and draw the selected shape with the cursor.
- To add a comment to the drawn shape, move the cursor over the shape until an arrowhead appears.
- Double click on the shape and type any text in the red box that appears.







This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

## Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybrbi](http://www.elsevier.com/locate/ybrbi)

# NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder



Elísabet Alcocer-Gómez<sup>a</sup>, Manuel de Miguel<sup>b</sup>, Nieves Casas-Barquero<sup>c</sup>, Jéssica Núñez-Vasco<sup>b</sup>, José Antonio Sánchez-Alcazar<sup>a</sup>, Ana Fernández-Rodríguez<sup>b</sup>, Mario D. Cordero<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, 41013 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Dpto. Citología e Histología Normal y Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla, Spain

<sup>c</sup> Dpto. Psiquiatría, Hospital Universitario Virgen Macarena, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Spain

<sup>d</sup> Research Laboratory, Dental School, University of Sevilla, Sevilla, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 August 2013

Received in revised form 17 October 2013

Accepted 17 October 2013

Available online 24 October 2013

## Keywords:

Depression  
Inflammation  
Inflammasome  
Oxidative stress  
Amitriptyline  
Antidepressants

## ABSTRACT

**Introduction:** Major depressive disorder (MDD) is a very prevalent disease which pathogenic mechanism remains elusive. There are some hypotheses and pilot studies suggesting that cytokines may play an important role in MDD. In this respect, we have investigated the role of NLRP3 inflammasome complex in the maturation of caspase-1 and the processing of its substrates, IL-1 $\beta$  and IL-18, in blood cells from MDD patients.

**Methods:** Forty MDD patients were selected for this study, twenty without treatments and twenty treated with amitriptyline, a common tricyclic antidepressant. Blood samples from twenty healthy volunteers were included in the study. The inflammasome activation was studied by Western blot and real-time PCR of NLRP3 and caspase 1 and serum levels of IL-1 $\beta$  and 18.

**Results:** We observed increased gene expression of NLRP3 and caspase-1 in blood cells, and increased serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in non-treated patients. IL-1 $\beta$  and IL-18 correlated with Beck Depression Inventory (BDI) scores of MDD patients. Interestingly, amitriptyline treatment reduced NLRP3 and caspase-1 gene expression, and IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels. As it is well established that oxidative stress is associated with NLRP3 inflammasome activation, we next studied mitochondrial ROS and lipid peroxidation (LPO) levels in MDD patients. Increased levels of mitochondrial ROS and LPO were observed in MDD patients, however oxidative damage was higher in MDD patients treated with amitriptyline.

**Conclusions:** These findings provide new insight into the pathogenesis of MDD and the effects of amitriptyline treatment on NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a severe and potentially debilitating psychiatric illness that is characterized by a significant change in mood accompanied by other symptoms such as low self-esteem, anhedonia, and disrupted sleeping, eating, and cognition. It has been estimated to be the second major illness in social and economic burden by 2020, exceeding all diseases except ischemic heart disease (Greden, 2001; Murray and Lopez, 1997). Despite the fact that it affects up to 10% of the general population worldwide, its pathogenic mechanism remains elusive (Kessler, 2012). Consequently, research is now aimed at characterizing its

pathophysiology at the cellular and molecular level. There are some hypotheses and pilot studies suggesting that cytokines may play an important role in MDD (Gardner and Boles, 2011; Maes et al., 1993; Rawdin et al., 2012; Maes, 1995), associated with other alterations such as oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Gardner et al., 2003; Gardner and Boles, 2011; Rawdin et al., 2012). A large body of evidence suggests that MDD is accompanied by activation of inflammatory pathways, reflected by an increased levels of inflammatory cytokines, such as Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and TNF $\alpha$  (Dowlati et al., 2010; Maes et al., 1993; Rawdin et al., 2012). Other small-scale studies also suggest antidepressant effects of anti-inflammatory medications (Muller et al., 2006; Nery et al., 2008), as well as anti-inflammatory effects of antidepressants (Hannestad et al., 2011; Abbasi et al., 2012). Interestingly, IL-1 $\beta$  is one of the two known cytokines, together with IL-18, activated by the inflammasome complex. The inflammasome is a protein complex that comprises an intracellular sensor, typically

\* Corresponding author. Address: Research Laboratory, Dental School, Universidad de Sevilla, C/Avicena s/n, 41009 Sevilla, Spain. Tel.: +34 954 481120; fax: +34 954 486784.

E-mail address: [mdcormor@us.es](mailto:mdcormor@us.es) (M.D. Cordero).

a Nod-like receptor (NLR), the precursor procaspase-1 and the adaptor ASC. Inflammasome activation leads to the maturation of caspase-1 and the processing of its substrates, IL-1 $\beta$  and IL-18 (Leemans et al., 2011). Of all the NLRs, NLRP3 is activated by the most diverse array of danger signals. Mitochondrial dysfunction and ROS have also been shown to be an important activator of inflammasome-mediated inflammation (Zhou et al., 2011). In agreement with these results, several mitochondrial alterations have been described in patients and animal models of depression, such as mitochondrial chain dysfunction, low levels of ATP or low levels of Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) (Gardner et al., 2003; Maes et al., 2009; Moreno-Fernández et al., 2012; Rezin et al., 2008). However, it is not clear how mitochondrial alterations can be involved in the depressive process.

Recently, a new inflammasome hypothesis of depression and related comorbid systemic illnesses has been proposed by Iwata and co-workers (Iwata et al., 2013). According to this hypothesis, the inflammasome is a central mediator by which psychological and physical stressors could contribute to the development of depression (Iwata et al., 2013). The present study examined the hypothesis to determine whether NLRP3 inflammasome is activated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from MDD patients and the implication of mitochondrial oxidative stress. Furthermore, we studied the effect of amitriptyline, a tricyclic antidepressant, on NLRP3 inflammasome activation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethical statements

Written informed consents and the approval of the ethical committee of University of Seville were obtained, according to the principles of the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Patients

Twenty patients with major depression in first episode without treatment with a DSM-IV diagnosis of melancholic depression (DSM-IV code: F33) were collected from the Service of Psychiatry of Hospital Virgen Macarena, in Seville, Spain. The diagnosis was established by personal interview according to diagnostic criteria of DSM-IV. In parallel, we select twenty patients treated with amitriptyline in order to evaluate the effect of the antidepressant in inflammatory markers. All patients were also evaluated using the Beck Depression Inventory (BDI) (41.5  $\pm$  8.3 is the mean of all depressed patients). Any suicide attempts were registered in all patients. All patients were recruited after a depressive episode. Patients not treated were included consecutively after diagnosis and before any antidepressant medication regimen was started. A few men were included in this study because of the low number of men affected by major depression in the Service of Psychiatry of Hospital Virgen Macarena at the time of the study. Patients on amitriptyline treatment were stable as confirmed by follow-up outpatient clinics. All patients followed chronic amitriptyline monotherapy treatment for a minimum of 10 months at doses considered clinically effective by their physicians. These doses were highly homogeneous (62.5  $\pm$  12 mg/d). Patients without treatment had not taken medication before of the study and they were selected in the first episode. All patients were at least 18 years of age (age and sex in Table 1), and either they or their legal representatives gave informed consent to be included in the study. Blood samples from twenty healthy volunteers (males/5, females/15) were included in the study matching the age range, gender, ethnicity, and demographics of the recruited patients. The protocol has

**Table 1**

Age, sex, doses and time on treatment at the moment of peripheral venous blood isolation.

	Control	Non treated	Amitriptyline
No. patients	20	20	20
Age (yrs)	57 $\pm$ 3	54.4 $\pm$ 10.1	53.5 $\pm$ 9.8
Sex (female/male)	18/2	18/2	19/1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.6 $\pm$ 5.1	23.3 $\pm$ 3.2	22.9 $\pm$ 3.9
Doses (mg/d)	-	-	62.5 $\pm$ 12
Months under treatment	-	-	12.1 $\pm$ 2.3

been carried out in accordance with the declaration of Helsinki and approved by the ethical committee of our institution.

### 2.3. In vitro experiments

THP-1 cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, an antibiotic/antimycotic solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and 10% fetal bovine serum. THP-1 cells were cultured with 5 mM ATP during 6 and 12 h with and without 0.5, 1 and 5  $\mu$ M amitriptyline.

### 2.4. Immunoblotting

Western blotting was performed using standard methods. After protein transfer, the membrane was incubated with various primary antibodies diluted 1:1000, and then with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase at a 1:10000 dilution. Specific protein complexes were identified using the Immuno Star HRP substrate kit (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Anti-GAPDH monoclonal antibody from Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Anti-NLRP3 antibody from Adipogen (San Diego, USA).

### 2.5. Serum and blood mononuclear cells isolation

Coagulated and non-coagulated bloods were collected after 12-h fasting, between 8:00 and 10:00 AM from patients and healthy age- and sex-matched control subjects, centrifuged at 3800 g for 5 min, and serum was stored at –80 °C until testing. PBMC were purified from heparinized blood by isopycnic centrifugation using Histopaque-1119 and Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### 2.6. IL-1 $\beta$ and IL-18 levels

IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in serum or culture mediums were assayed in duplicates by commercial ELISA kits (MyBioSource, Inc., CA, USA).

### 2.7. Real-time quantitative PCR

The expression of NLRP3 and caspase 1 gene was analyzed by SYBR Green quantitative PCR using mRNA extracts of PBMC from patients and controls. Total cellular RNA was purified from PBMC using the Trisure method (Bioline, London, UK), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined spectrophotometrically. In order to avoid genomic DNA contamination, one microgram of total RNA from each sample was incubated in gDNA wipeout buffer (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden, Germany) at 42 °C for 5 min. RNA samples were subsequently retrotranscribed to cDNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The thermal cycling conditions used were: denaturation at 95 °C for 20 s,



alignment at 54 °C for 20 s and elongation at 72 °C for 20 s, for 40 cycles. NLRP3 primers were: 5'- GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA -3' (forward) and 5'- GCTGTCTTCTGGCATATCACA -3' (reverse), Caspase 1 were: 5'- CCGAAGGTGATCATCATCCA -3' (forward) and 5'- ATAGCATCATCTCAAACCTTCTG -3' (reverse) and IL-1 $\beta$  were: 5'- TTACAGTGGCAATGAGGATGAC -3' (forward) and 5'- GTCGGA GATTCGTAGCTGGAT-3' (reverse). We used a second pair of beta-actin primers as an internal control; forward: 5'-CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3' and reverse: 5'- ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'. All reactions were performed in duplicate. Reaction mixtures, without RNA, were used as negative controls in each run.

Absence of genomic DNA contamination was confirmed by setting up control reactions that do not contain reverse transcriptase. Fold changes in the expression of genes of interest were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

## 2.8. Mitochondrial ROS production

Mitochondrial ROS generation in PBMC and fibroblasts were assessed by MitoSOX™ red, a red mitochondrial superoxide indicator. MitoSOX Red is a novel fluorogenic dye recently developed and validated for highly selective detection of superoxide in the mitochondria of live cells (Mukhopadhyay et al., 2007). MitoSOX™ Red reagent is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, MitoSOX™ Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence. Approximately  $1 \times 10^6$  cells were incubated with 1  $\mu$ M MitoSOX™ red for 30 min at 37 °C, washed twice with PBS, resuspended in 500  $\mu$ l of PBS and analyzed by flow cytometry in

an Epics XL cytometer, Beckman Coulter, Brea, California, USA (excitation at 510 and fluorescence detection at 580 nm).

## 2.9. Lipid peroxidation (LPO)

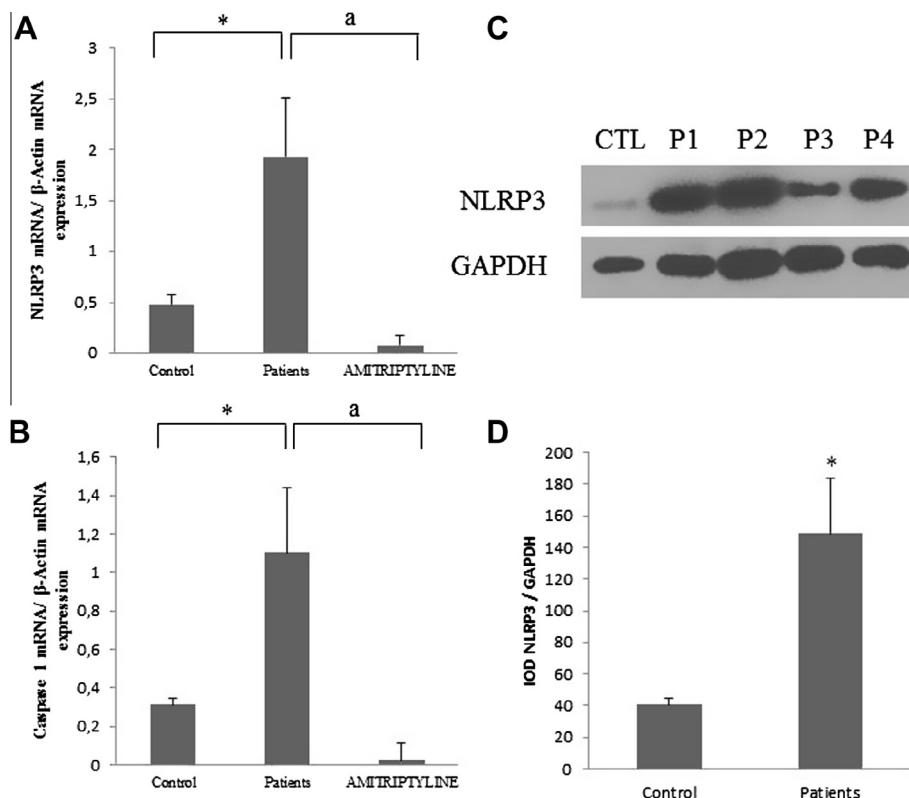
Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in plasma and cells were determined by a method based on the reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 90–100 °C using a commercial kit from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). TBARS are expressed in terms of malondialdehyde (MDA) levels. In these assays, a MDA standard is used to construct a standard curve against which unknown samples can be plotted.

## 2.10. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS package for Windows (SPSS, Chicago, IL). Unless otherwise indicated, data represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis of differences observed between numeric parameters of all groups was performed by one-way ANOVA using an all pairwise multiple comparison procedure (Tukey's test) for correction. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical analyses included Pearson's correlations between IL-1 $\beta$  and IL-18 respect to BDI. Partial correlations for controlling for confounder antidepressant effect were also performed.

## 3. Results

Forty patients and twenty healthy people (Control group) were included in the study: major depression without amitriptyline treatment (N/T group), and major depression with treatment (Ami-



**Fig. 1.** NLRP3-Inflammasome activation in PBMC from MDD patients. **Panel A–B.** NLRP3 and caspase 1 transcript expression levels relative to  $\beta$ -actin were determined by real-time quantitative RT-PCR as described in Material and methods;  $n = 20$  for control,  $n = 20$  for MDD and  $n = 20$  for amitriptyline treated MDD groups respectively. **Panel C.** NLRP3 protein levels were analysed by Western blotting using PBMC from four representative patients, compared with a pool of 3 healthy age- and sex-matched control (CTL) subjects. **Panel D** Mean of protein expression of all patients. Protein expression levels were quantified by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different Western blots and normalized to GAPDH signal. \* $P < 0.001$  between control and MDD patients; \* $P < 0.001$  between MDD and amitriptyline treated patients. Data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments.

tricytline group). As shown in Table 1, there were no statistical differences between groups according to age and sex. The N/T group showed a significant increase of the BDI score ( $40.9 \pm 5.9$ ) compared to both the Amitriptyline group ( $8.2 \pm 4.6$ ) and the control group ( $3.4 \pm 3.8$ ) (d.f. = 110,  $F = 14.291$ ,  $P < 0.001$ ).

### 3.1. NLRP3 inflammasome is activated in PBMC from MDD patients

We found increased NLRP3 ( $P < 0.01$ ) and caspase-1 ( $P < 0.01$ ) gene expression relative to  $\beta$ -actin in PBMC from MDD patients respect to controls suggesting inflammasome activation (Fig. 1A and B). Increased gene expression was also associated with increased NLRP3 protein expression levels in PBMC from MDD patients (Fig. 1C and D). Furthermore, other proteins involved in inflammasome and inflammation activation, such as IL-1 $\beta$  and IL-18, were significantly increased in serum from MDD patients (Fig. 2A and B). IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels showed high positive correlation with BDI scores of MDD patients (Fig. 2C and D). This data suggests that high IL-1 $\beta$  and IL-18 levels may have a role in the pathophysiology of MDD. However, we did not observe a significant correlation between BDI and NLRP3 or Caspase-1 gene expression levels which may be due to the reduced number of samples.

### 3.2. Amitriptyline reduces NLRP3 inflammasome activation in MDD patients

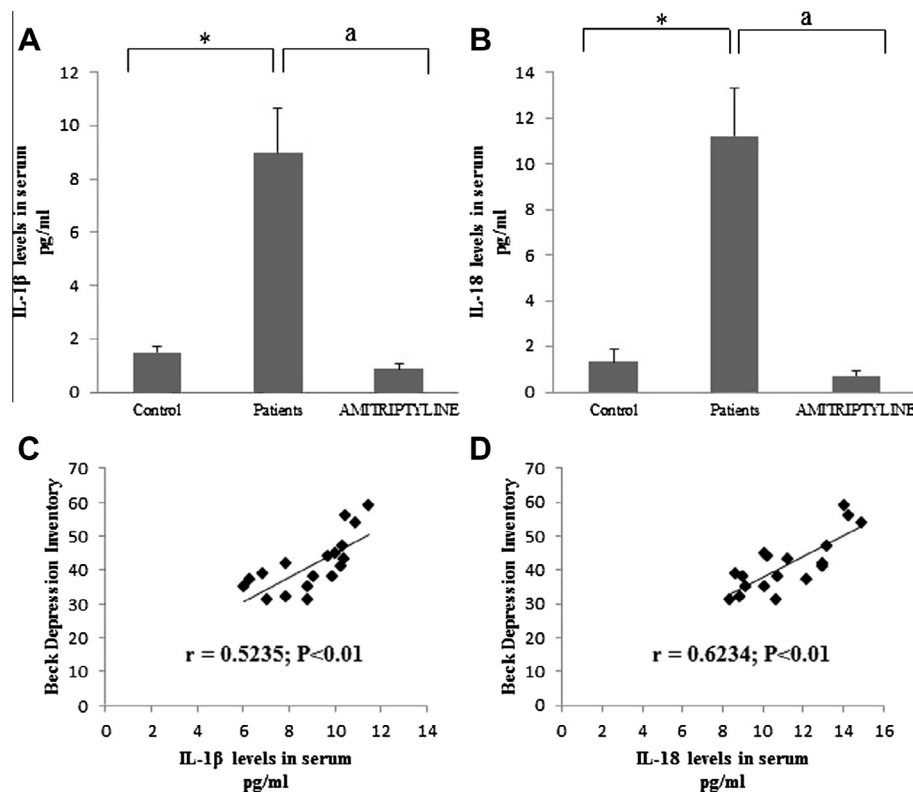
It has been previously reported that tricyclic antidepressants (TCA) and SSRIs normalize serum levels of inflammatory cytokines in depressed patients, as well as increase the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Hannestad et al., 2011; Iwata et al., 2013). In this respect, we have studied the NLRP3

inflammasome activation in MDD patients treated with amitriptyline. Patients showed NLRP3 and Caspase-1 gene down-regulation after amitriptyline treatment respect to controls (Fig. 1A–B). Furthermore, IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels were significantly reduced respect to controls (Fig. 2A–B). Next, partial correlation analysis was used to determine the strength of the association of BDI scores with IL-1 $\beta$  and IL-18 serum levels, after controlling for amitriptyline treatment. This association was reduced when controlling for antidepressant treatment ( $r = 0.275$ ;  $P < 0.21$  and  $r = 0.309$   $P < 0.18$  for IL-1 $\beta$  and IL-18 respectively).

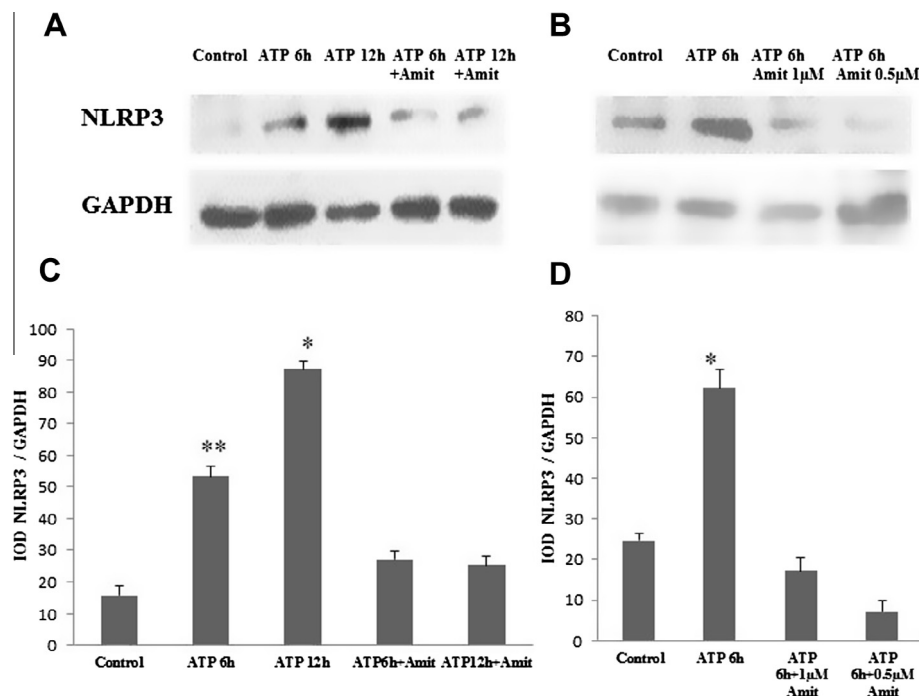
To verify the effect of amitriptyline on NLRP3 up-regulation, inflammasome was activated in THP-1 cells by treatment with 5 mM ATP in the presence or absence of amitriptyline (0.5, 1 and 5  $\mu$ M) and NLRP3 expression levels were evaluated by Western blot. Results showed that amitriptyline prevented the increased NLRP3 protein expression levels induced by ATP in THP-1 cells (Fig. 3A and B).

### 3.3. Oxidative stress in PBMC from MDD patients

In order to assess oxidative stress in MDD, we determined mitochondrial ROS production in PBMC from control and N/T group by using MitoSOX, a mitochondrial superoxide indicator. Mitochondrial superoxide production was significantly increased in PBMC from N/T group respect to controls ( $P < 0.001$ ) (Fig. 4A). Additionally, we determined LPO as a marker of oxidative stress-induced membrane damage by mitochondrial ROS. Levels of LPO were significantly higher in PBMC from N/T group (Fig. 4B). However, amitriptyline treatment was not able to reduce oxidative stress in PBMC from MDD patients (Fig. 4A and B). Rather the opposite, amitriptyline treatment significantly increased ROS and LPO levels in



**Fig. 2.** Inflammatory cytokines in serum from MDD patients. **Panel A–B.** IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in serum from control, non-treated and treated MDD patients were determined by ELISA as described in Material and Methods.  $n = 20$  for control,  $n = 20$  for MDD and  $n = 20$  for amitriptyline treated MDD groups respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $P < 0.001$  between control and MDD, \* $P < 0.001$  between MDD and amitriptyline treated patients. **Panel C–D** Correlation of IL-1 $\beta$  (C), and IL-18 levels (D) in serum from MDD patients with Beck Depression Inventory score. The correlation was established by calculating correlation coefficients.



**Fig. 3.** Effect of amitriptyline in NLRP3 inflammasome activation. **Panel A and B.** NLRP3 protein expression levels were determined in THP-1 after 6 and 12 h treatment with 5 mM ATP in the presence or absence of 5, 1 and 0.5 μM amitriptyline (Amit) by Western blotting. **Panel C and D.** Protein levels were quantified by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different Western blots from three independent experiments and normalized to GAPDH signal. \* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$  between control and MDD patients.

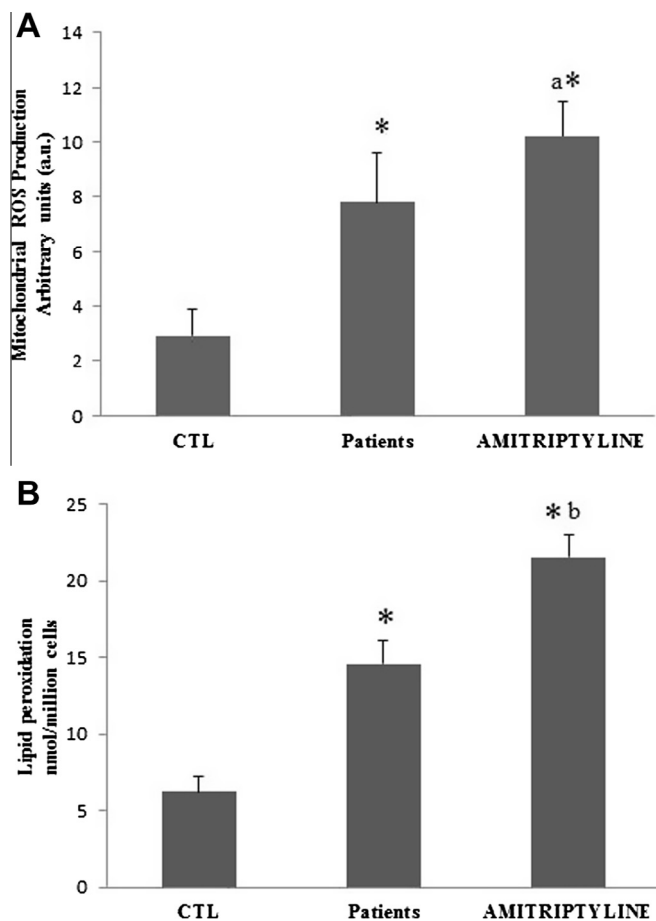
PBMC (Fig. 4B). Furthermore, we did not find any significant correlation between oxidative parameters and inflammasome markers in PBMC from MDD patients (data not shown).

#### 4. Discussion

Recently, inflammasome has emerged as an unexpected sensor for metabolic danger and stress. Indeed, it has been implicated in the development of major diseases such as gout, type 2 diabetes and obesity-induced insulin resistance. Moreover, the NLRP3 inflammasome is increasingly suspected of playing a major role in other human pathologies such as cancer, cardiovascular diseases and other systemic diseases (Menu and Vince, 2011), all of which are comorbid systemic illnesses related with depression (Iwata et al., 2013). In the present study, we found increase NLRP3 activation in PBMC from MDD patients, and increase serum levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β and IL-18. The maturation and release of IL-1β has been implicated in stress, depression and central nervous system (CNS) dysregulation (Iwata et al., 2013). Interestingly, IL-18 has also been observed to exacerbate CNS inflammation (Jha et al., 2010) and activates both intrinsic and extrinsic pro-apoptotic signaling pathways (Chandrasekar et al., 2004). Furthermore, it has been suggested that apoptosis plays an important role in the pathophysiology of depression (Shelton et al., 2011; Szuster-Ciesielska et al., 2008). In this respect, activation of caspase-1 leads to the processing of IL-1β and IL-18 through a process that is thought to be analogous to apoptosome formation in response to apoptotic stimuli (Davis et al., 2011). However, there are discrepancies regarding the pathological role of inflammation in MDD (Raison and Miller, 2011). Because the relationship between distress and inflammation is bidirectional, depression enhances inflammation and inflammation promotes depression, these discrepancies could be the result of the presence of subgroups of patients with different levels of psychological stress. Ele-

vations in pro-inflammatory cytokines and other inflammation-related proteins in major depression were found in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) as well as in postmortem studies. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines persist after clinical symptoms of depression are in remission and can also predict the onset of a depressive episode (Raedler, 2011). Taken together, these results suggest that individuals with increased inflammation comprise a depressive subtype (Raison and Miller, 2011). Furthermore, it has been found that antidepressant treatment reduces serum levels of IL-1β, but not TNFα, suggesting that IL-1β plays a major role in treatment response (Hannestad et al., 2011) and it can be used as a potential functional biomarker of depression (Schmidt et al., 2011). In this respect, we studied the inflammasome activation in MDD patients treated with amitriptyline. MDD patients showed reduced serum levels of IL-1β and IL-18, and a significant reduction in NLRP3 and caspase-1 activation. Partial correlation analysis showed that the association of BDI scores with IL-1β and IL-18 serum levels was reduced when controlling for antidepressant treatment, suggesting that in some extent antidepressant can modulate inflammation levels. In agreement with these results, it has been described that TCA and SSRIs normalize serum levels of inflammatory cytokines in depressed patients (Kenis and Maes, 2002; Raedler, 2011), and that amitriptyline has anti-inflammatory effects and reduces IL-1β serum levels (Vismari et al., 2012).

Several metabolic damages such as oxidative stress and ROS production have been described to activate inflammasome (Zhou et al., 2011). In order to explore the implication of oxidative stress in inflammasome-mediated inflammation observed in MDD patients, we determined several oxidative parameters in PBMC from patients with MDD. We detected increased mitochondrial ROS production and lipid peroxidation in PBMC from the N/T group. However, we have not observed correlation between mitochondrial ROS production and inflammasome activation. Furthermore, amitriptyline treatment increased oxidative stress



**Fig. 4.** ROS production and lipid peroxidation in MDD patients. **Panel A–B.** ROS and lipid peroxidation from controls (CTL), non-treated and amitriptyline-treated MDD patients. Data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $P < 0.001$  between control and MDD patients, <sup>a</sup> $P < 0.05$  between patients and amitriptyline treated patients, <sup>b</sup> $P < 0.005$  between patients and amitriptyline treated patients.

despite reducing inflammasome activation. In agreement with this hypothesis, it has been previously shown that antidepressants as TCA and SSRIs induced oxidative stress and mitochondrial damage (Li et al., 2012; Moreno-Fernández et al., 2012; Hroudova and Fisar, 2010).

Since a bidirectional relationship exists between mitochondria and inflammation, it is very difficult to establish if the relationship between depression and inflammation is due to a primary disturbance of inflammatory pathways, or secondary to an inflammation due to a primary disturbance of mitochondrial function. According to our data, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in MDD are independent events to inflammasome activation. Supporting this hypothesis, it has been described that several inflammatory cytokines such as, TNF- $\alpha$  and the inflammasome cytokine IL-1 $\beta$ , induce mitochondrial dysfunction (Mairappan et al., 2009; López-Armada et al., 2006).

According to our data, mitochondrial dysfunction is not involved in inflammasome activation in MDD patients. Therefore, we propose two alternative hypotheses of inflammasome activation. First, a psychological stress as inductor of increased IL-1 $\beta$  serum levels (Iwata et al., 2013) and IL-18 (Kokai et al., 2002). Molecular mechanisms by which psychological stress could induce activation of inflammasome are unknown. One plausible hypothesis would be to explore the role of molecules involved in NLRP3 inflammasome activation such as ATP release (Gombault et al., 2013). In agreement with this hypothesis, Iwata and co-workers have reported increased ATP levels in the hippocampus after stress

exposition (Iwata et al., 2013). Likewise, it could be interesting to investigate the role of molecules involved in the pathophysiology of MDD which could have potential to induce NLRP3 inflammasome activation. Supporting this hypothesis, it has been showed that cortisol correlate with increased levels of IL-1 $\beta$  in hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis dysregulation such as in anorexia nervosa (Limone et al., 2000). A second hypothesis recently proposed by Gold et al. predicts that uncontrolled endoplasmic reticulum stress (ER stress) response could contribute to the pathophysiology of MDD or bipolar disorders (Gold et al., 2012) and it has been demonstrated that ER stress has a major role in inflammasome activation (Menu et al., 2012). Interestingly, both hypotheses could be interconnected because there are results which offer good evidence of the activation of ER stress mechanisms after psychological stress (Pavlovsky et al., 2013).

However, we are aware of the limitation of our study. Given the complexity of the disease, the reduced number of patients and the importance of a rapid clinical approach of MDD patients, it is very complicated to obtain samples in similar conditions. Furthermore, we have not controlled several variables as food consumption and weight loss which may have influenced the results. Therefore, further analysis involving more samples from MDD patients will be required to confirm our findings. Indeed, our research group is currently working in this direction, on the basis of the conclusions of the exploratory work discussed in this article.

#### Conflict of interest

All the Authors declare that no conflict of interest exists for any of them.

#### Acknowledgments

This work has been supported by FOICAM (Spanish research association) and Lundbeck.

#### References

- Abbasi, S.H., Hosseini, F., Modabbernia, A., Ashrafi, M., Akhondzadeh, S., 2012. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J. Affect. Disord.* 141, 308–314.
- Chandrasekar, B., Vemula, K., Surabhi, R.M., Li-Weber, M., Owen-Schaub, L.B., Jensen, L.E., Mummid, S., 2004. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 20221–20233.
- Davis, B.K., Wen, H., Ting, J.P., 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 707–735.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L., 2010. A metaanalysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry* 67, 446–457.
- Gardner, A., Johansson, A., Wibom, R., Nennesmo, I., von Döbeln, U., Hagenfeldt, L., Hällström, T., 2003. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J. Affect. Disord.* 76, 55–68.
- Gardner, A., Boles, R.G., 2011. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 730–743.
- Gold, P.W., Licinio, J., Pavlatou, M.G., 2012. Pathological parainflammation and endoplasmic reticulum stress in depression: potential translational targets through the CNS insulin, klotho and PPAR- $\gamma$  systems. *Mol. Psychiatry* 18, 154–165.
- Gombault, A., Baron, L., Couillin, I., 2013. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front. Immunol.* 3, 414.
- Greden, J.F., 2001. The burden of disease for treatment-resistant depression. *J. Clin. Psychiatry* 62 (Suppl 16), 26–31.
- Hannestad, J., DellaGioia, N., Bloch, M., 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a metaanalysis. *Neuropsychopharmacology* 36, 2452–2459.
- Hroudova, J., Fisar, Z., 2010. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31, 336–342.
- Iwata, M., Ota, K.T., Duman, R.S., 2013. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav. Immun.* 31, 105–114.

- Jha, S., Srivastava, S.Y., Brickey, W.J., Iocca, H., Toews, A., Morrison, J.P., Chen, V.S., Gris, D., Matsushima, G.K., Ting, J.P., 2010. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J. Neurosci.* 30, 15811–15820.
- Kenis, G., Maes, M., 2002. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 5, 401–412.
- Kessler, R.C., 2012. The costs of depression. *Psychiatr. Clin. North Am.* 35, 1–14.
- Kokai, M., Kashiwamura, S., Okamura, H., Ohara, K., Morita, Y., 2002. Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders. *J. Immunother.* 25, S68–S71.
- Leemans, J.C., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., 2011. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol. Rev.* 243, 152–162.
- Li, Y., Couch, L., Higuchi, M., Fang, J.L., Guo, L., 2012. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. *Toxicol. Sci.* 127, 582–591.
- Limone, P., Biglino, A., Bottino, F., Forno, B., Calvelli, P., Fassino, S., Berardi, C., Ajmone-Catt, P., Bertagna, A., Tarocco, R.P., Rovera, G.G., Molinatti, G.M., 2000. Evidence for a positive correlation between serum cortisol levels and IL-1 $\beta$  production by peripheral mononuclear cells in anorexia nervosa. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 422–427.
- López-Armada, M.J., Caramés, B., Martín, M.A., Cillero-Pastor, B., Lires-Dean, M., Fuentes-Boquete, I., Arenas, J., Blanco, F.J., 2006. Mitochondrial activity is modulated by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1011–1022.
- Maes, M., Bosmans, E., Meltzer, H.Y., Scharpe, S., Suy, E., 1993. Interleukin-1  $\beta$ : a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am. J. Psychiatry* 150, 1189–1193.
- Maes, M., 1995. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 19, 11–38.
- Maes, M., Mihaylova, I., Kubera, M., Uytendaele, M., Vrydags, N., Bosmans, E., 2009. Lower plasma Coenzyme Q10 in depression: a marker for treatment resistance and chronic fatigue in depression and a risk factor for cardiovascular disorder in that illness. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30, 462–469.
- Mariappan, N., Elks, C.M., Fink, B., Francis, J., 2009. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 462–470.
- Menu, P., Vince, J.E., 2011. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin. Exp. Immunol.* 166, 1–15.
- Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., Tschopp, J., 2012. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis.* 3, e261.
- Moreno-Fernández, A.M., Cordero, M.D., Garrido-Maraver, J., Alcocer-Gómez, E., Casas-Barquero, N., Carmona-López, M.I., Sánchez-Alcázar, J.A., de Miguel, M., 2012. Oral treatment with amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative stress in psychiatric patients. *J. Psychiatr. Res.* 46, 341–345.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., Pacher, P., 2007. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 203–208.
- Muller, N., Schwarz, M.J., Dehning, S., Douhe, A., Cerovecki, A., Goldstein-Muller, B., Spellmann, I., Hetzel, G., Maino, K., Kleindienst, N., Möller, H.J., Arolt, V., Riedel, M., 2006. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol. Psychiatry* 11, 680–684.
- Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: global burden of disease study. *Lancet* 349, 1498–1504.
- Nery, F.G., Monkul, E.S., Hatch, J.P., Fonseca, M., Zunta-Soares, G.B., Frey, B.N., Bowden, C.L., Soares, J.C., 2008. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum. Psychopharmacol.* 23, 87–94.
- Pavlovsky, A.A., Boehning, D., Li, D., Zhang, Y., Fan, X., Green, T.A., 2013. Psychological stress, cocaine and natural reward each induce endoplasmic reticulum stress genes in rat brain. *Neuroscience* 246, 160–169.
- Raedler, T.J., 2011. Inflammatory mechanisms in major depressive disorder. *Curr. Opin. Psychiatry* 24, 519–525.
- Raison, C.L., Miller, A.H., 2011. Is depression an inflammatory disorder? *Curr. Psychiatry Rep.* 13, 467–475.
- Rawdin, B.S., Mellon, S.H., Dhabhar, F.S., Epel, E.S., Puterman, E., Su, Y., Burke, H.M., Reus, V.I., Rosser, R., Hamilton, S.P., Nelson, J.C., Wolkowitz, O.M., 2012. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav. Immun.* S0889–1591, 00497–7.
- Rezin, G.T., Cardoso, M.R., Gonçalves, C.L., Scaini, G., Fraga, D.B., Riegel, R.E., et al., 2008. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem. Int.* 53, 395–400.
- Shelton, R.C., Claiborne, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Reddy, R., Aschner, M., Lewis, D.A., Mirnics, K., 2011. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol. Psychiatry* 16, 751–762.
- Schmidt, H.D., Shelton, R.C., Duman, R.S., 2011. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 36, 2375–2394.
- Szuster-Ciesielska, A., Słotwińska, M., Stachura, A., Marmurowska-Michałowska, H., Dubas-Slemp, H., Bojarska-Junak, A., Kandefer-Szerszeń, M., 2008. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 686–694.
- Vismari, L., Alves, G.J., Muscarà, M.N., Palermo-Neto, J., 2012. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34, 578–585.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J., 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.



# *Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome*

**Elísabet Alcocer-Gómez, Cristina Ulecia-Morón, Fabiola Marín-Aguilar, Tatyana Rybkina, Nieves Casas-Barquero, Jesús Ruiz-Cabello, et al.**

**Molecular Neurobiology**

ISSN 0893-7648

Mol Neurobiol

DOI 10.1007/s12035-015-9408-7



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome

Elísabet Alcocer-Gómez<sup>1</sup> · Cristina Ulecia-Morón<sup>2</sup> · Fabiola Marín-Aguilar<sup>3</sup> · Tatyana Rybkina<sup>2</sup> · Nieves Casas-Barquero<sup>4</sup> · Jesús Ruiz-Cabello<sup>5</sup> · Bernhard Ryffel<sup>6</sup> · Lionel Apetoh<sup>7,8,9</sup> · François Ghiringhelli<sup>7,8,9</sup> · Pedro Bullón<sup>3</sup> · José Antonio Sánchez-Alcazar<sup>1</sup> · Angel M. Carrión<sup>2</sup> · Mario D. Cordero<sup>3,10,11</sup>

Received: 18 May 2015 / Accepted: 23 August 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Depression is a major public health concern in modern society, yet little is known about the molecular link between this condition and neuroinflammation. The inflammasome complex was recently shown to be implicated in depression. The present study shows the implication of

NLRP3 inflammasome in animal model of stress-induced depression. Accordingly, we show here that in the absence of a NLRP3 inflammasome, prolonged stress does not provoke depressive behaviors or microglial activation in mice or dampen hippocampal neurogenesis. Indeed, NLRP3 deletion or inhibition of microglial activation impairs the stress-induced alterations associated with depression. According to these findings in animal model, the inflammasome could be a target for new therapeutic interventions to prevent depression in patients.

**Keywords** Stress · Depression · Inflammasome · Microglia

✉ Angel M. Carrión  
amancar@upo.es

✉ Mario D. Cordero  
mdcormor@us.es

- <sup>1</sup> Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, 41013 Sevilla, Spain
- <sup>2</sup> Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Carretera de Utrera Km. 1, 41013 Sevilla, Spain
- <sup>3</sup> Research Laboratory, Dental School, University of Sevilla, Sevilla, Spain
- <sup>4</sup> Dpto. Psiquiatría, Hospital Universitario Virgen Macarena, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
- <sup>5</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain; Advanced Imaging Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares and Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain
- <sup>6</sup> CNRS, UMR7355, Orléans, France
- <sup>7</sup> INSERM, UMR866, Dijon, France
- <sup>8</sup> Centre Georges François Leclerc, Dijon, France
- <sup>9</sup> Université de Bourgogne, Dijon, France
- <sup>10</sup> IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío-CSIC-University of Seville Spain, Sevilla, Spain
- <sup>11</sup> IBiS Institute of Biomedicine of Seville, Universidad de Sevilla, C/Calle Antonio Maura Montaner s/n, 41013 Sevilla, Spain

## Introduction

Exposure to stress provokes disturbances to physiological homeostasis, and it may have a detrimental impact on certain brain functions. Uncontrollable stress is a major contributing factor for major depressive disorder (MDD) [1], a severe and potentially debilitating psychiatric illness characterized by a significant change in mood that is accompanied by other symptoms, such as low self-esteem, anhedonia and disrupted sleeping, eating, and cognition [2]. The growing social and economic demands that are currently experienced in modern society are being paralleled by increased stress, resulting in a rapid rise in the prevalence of depression [3].

Recent evidence suggests that inflammation is an important factor in the pathophysiology of MDD and stress [4–6]. IL-1 $\beta$  seems to be a key factor in the proinflammatory response to psychological stress as it is a critical mediator of the antineurogenic and depressive-like behaviors caused by stress [5]. Together with IL-18, IL-1 $\beta$  is activated by the inflammasome complex [7], a protein complex that comprises an intracellular sensor, typically a NOD-like receptor (NLR),



the procaspase-1 precursor, and the ASC adaptor. Inflammasome has emerged recently as an unexpected sensor for metabolic danger and stress. Indeed, it has been implicated in the development of major diseases such as gout, type 2 diabetes, and obesity-induced insulin resistance and is increasingly suspected of playing a major role in other human pathologies such as cancer, asbestosis, and Alzheimer's disease [8]. Inflammasome activation leads to the maturation of caspase-1 and the processing of its substrates, IL-1 $\beta$  and IL-18. Of all the NLRs, NLRP3 is activated by the most diverse array of danger signals. Among the NLRs, it is NLRP3 that has been found to be activated in MDD patients [9] and in rodent models of depression [10, 11]. Indeed, the inflammasome was recently proposed to be a central mediator by which psychological and physical stressors could contribute to the development of depression and co-morbid systemic illnesses [1].

Accordingly, we have assessed whether the NLRP3 inflammasome is necessary for the development of stress-induced depression. To test this possibility, we evaluated the effects of chronic restraint stress (RS) in *nlrp3*<sup>+/+</sup> and *nlrp3*<sup>-/-</sup> mice. Our results showed that depressive-related behaviors are dependent on NLRP3 induction through a neuroinflammatory response and impaired neurogenesis. In addition, pharmacological inhibition of the microglial neuroinflammatory response prevents the molecular, cellular, and behavioral alterations induced by chronic RS. Thus, our data indicate that the NLRP3 inflammasome plays a pivotal role in stress-induced depression, suggesting that NLRP3 may represent a new therapeutic target to combat depressive disease.

## Materials and Methods

Animal studies were performed in accordance with the European Union guidelines (2010/63/EU) and Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (RD 53/2013 on the care of experimental animals: BOE 08/02/2013). All experiments were approved by the local institutional animal care committee.

### Animals and Drug Administration

Only male mice were used in these experiments, and the *Nlrp3*<sup>-/-</sup> transgenic mice (on a C57BL/6 background) have been described previously [12]. NALP3 targeting vector was electroporated into C57BL/6 embryonic stem (ES) cells (Ozgene). Homologous recombinant ES cells were identified by Southern blot analysis and microinjected into C57BL/6 blastocysts. Offspring were backcrossed to C57BL/6 mice, and germline transmission was confirmed by PCR of tail genomic DNA. Biological and phenotypic characteristics and lifespan are currently characterizing. Additional details on mice are given in reference 12.

Eight-week-old male C57/BL6/J mice weighing 25–30 g were maintained on a 12 h light/dark cycle. To avoid potential litter effects, each group came from different litters. After testing, the mice were anesthetized with CO<sub>2</sub> and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected for immediate biochemical analysis, while the hippocampus and prefrontal cortex (PFC) were isolated and frozen at -80 °C for further analyses. For the minocycline experiments, mice were randomly assigned to stressed saline-treated, stressed drug-treated, saline or minocycline groups, in which the mice received daily intraperitoneal injections of minocycline (10 mg/kg; Sigma-Aldrich) or of the vehicle alone (PBS).

### Behavioral Assays

Behavioral analyses were performed in a room with constant controlled noise and light. The testing apparatus was cleaned with 70 % ethanol (Panreac Química S.A.U) between trials to eliminate any influence of animal odor on the exploratory behavior. All animals in each group were tested.

### Immobilization Stress

Briefly, mice were confined in perforated 50-mL horizontal conical tubes for 2 h each day over a total of 30 days. During the 2 h period of stress by immobilization, both the stressed and control groups were deprived of food and water, and thereafter, food and water was provided ad libitum, and its intake was monitored daily. Restraint stress was performed at the same time each day, and it was not performed on the day of sacrifice. Four days before the sacrifice, we started the behavioral assays.

### Forced Swimming Test

The forced swimming test (FST) employed was essentially similar to that described elsewhere. Briefly, mice were placed individually in a transparent 2-L glass cylinder (19-cm tall) filled to a depth of 13 cm with water at 23 °C, and they were left there for 15 min. Twenty-four hours later, the mice were subjected to one 6-min session of swimming in water and they were scored off-line by an observer blind to the treatment considering minutes 2 to 6 of the session. Immobility was defined as the minimal movement possible to stay afloat.

### Social Interaction

Social interaction in pairs was performed in a neutral testing cage (gray Plexiglas box, 30 cm×30 cm×30 cm), with each mouse having been habituated to the testing cage for 10 min on two consecutive days. One day after the last habituation trial, two mice of the same genotype (the test and unfamiliar mice) were placed into the testing cage and their interaction

time was recorded over a period of 10 min, for example, the time spent investigating, following, and grooming. During this protocol, no aggressive behavior was observed. The interaction time was quantified off-line by two trained observers blind to the treatments.

### Sucrose Consumption Test

Three days before, the test mice were habituated to 1 % sucrose for 48 h. After overnight fluid deprivation, the mice were presented with two bottles containing 1 % sucrose or tap water for 1 h and the volumes consumed were measured the following morning. The amount of sucrose consumed was normalized to that of water for each animal (calculated from a 1-h consumption test following overnight fluid deprivation).

### Food Intake Test

Immediately after restraint stress, mice were allowed ad libitum access to food for 60 min in a 6 cm diameter  $\times$  1.5 cm glass bowl. As described previously [13], food consumption was calculated as the difference in the weight of the food before and after, presenting the results relative to the controls. After the test, the mice were allowed ad libitum access to food.

### Western Blotting

Western blotting was performed following a standard protocol, and after protein transfer, the membranes were probed with anti-IL-1 $\beta$  (p17; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:1000; the binding of which was detected with the corresponding horseradish peroxidase coupled secondary antibody (diluted 1:10,000). Specific protein complexes were identified using the Immun Star HRP substrate kit (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), and the amount of protein was normalized to GAPDH.

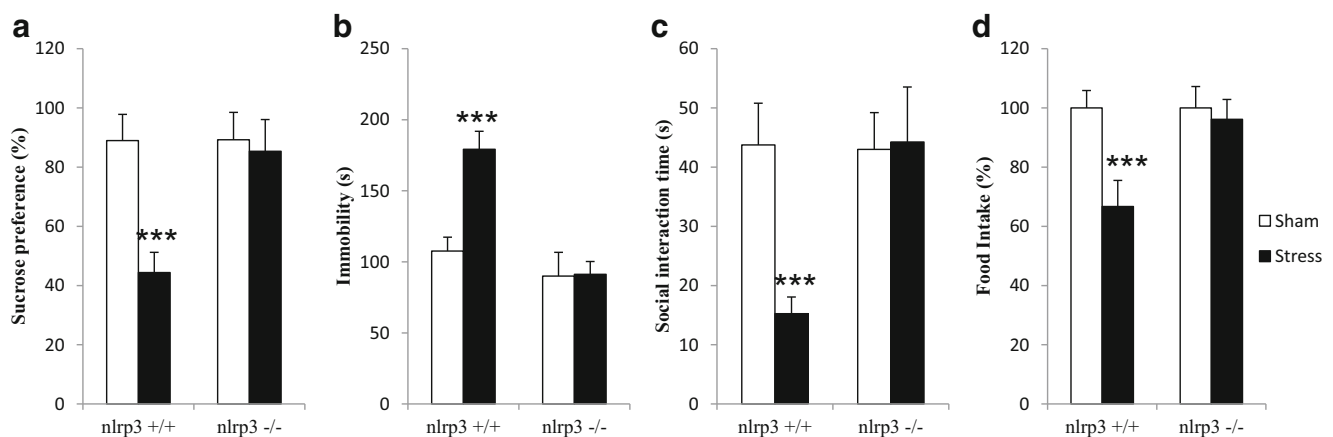
### ATP Levels

ATP levels were determined in a bioluminescence assay with an ATP determination kit (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Adenosine Levels

Homogenates (45  $\mu$ L) were examined using HR-MAS operating at 4  $^{\circ}$ C to reduce metabolic degradation.  $^1$ H NMR spectroscopy was performed at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer at 11.7 T. Samples were placed into a 50  $\mu$ L Zirconium oxide rotor using a rinsed cylindrical insert, together with 10  $\mu$ L of a 0.1 mM trimethylsilyl propionic acid (TSP) solution in deuterium water ( $D_2O$ ) and spun at 4000 Hz to remove the effects of spinning side bands from the acquired spectra.

To minimize the metabolic changes, the shimming and NMR preparation time were reduced to a minimum, while the sample for NMR spectroscopy was chilled to 4  $^{\circ}$ C. A number of 2D homonuclear and heteronuclear experiments were performed to carry out component assignments, such as standard gradient-enhanced correlation spectroscopy (COSY), proton total-correlated spectroscopy (TOCSY) and carbon-proton gradient-selected heteronuclear single quantum correlation (HSQC) protocols. Between consecutive 2D spectra, a control proton NMR spectrum was always measured. Standard solvent-suppressed spectra were grouped into 32,000 data points, averaged over 256 acquisitions, and the data acquisition lasted 13 min in total, using a sequence based on the first increment of the nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) pulse sequence to suppress the water and additional presaturation pulse during relaxation delay and mixing time. Sample acquisitions were obtained using a spectral width of 8333.33 Hz prior to Fourier transformation, and the free induction decay (FID) signals were multiplied by an exponential weight function corresponding to line broadening of 0.3 Hz. Spectra were referenced to the TSP

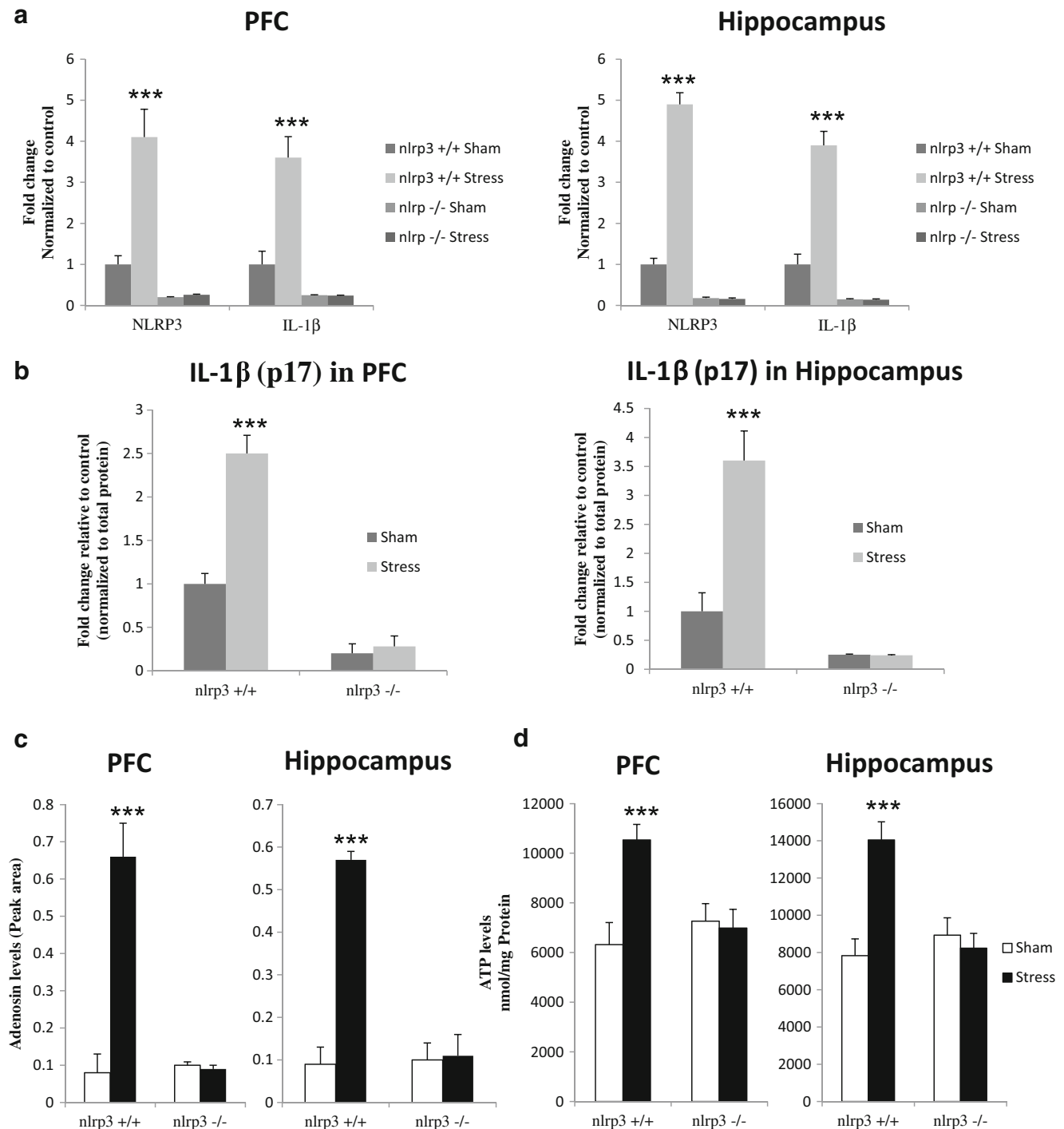


**Fig. 1** Deletion of *nlrp3* in mice prevents RS-induced depressive behaviors. **a** Sucrose preference, **b** mean immobility time, **c** social interactions, and **d** food intake tests. The results are all shown as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p$ <0.001 ( $N$ =10 for each group)

singlet at a 0 ppm chemical shift. The spectra were analyzed in MestReNova (rel. 9.0.1) and Phaseline (first and second order), linebase (using Whittaker smoother and, in most cases, automatic detection of filter and smooth factors), and peak fitting to Lorentzian shapes were applied using algorithms implemented in such software.

### Real-Time Quantitative PCR

The expression of the NLRP3 and IL-1 $\beta$  gene was analyzed by SYBR Green qPCR of messenger RNA (mRNA) extracted from the mouse hippocampus and PFC. Total cellular RNA was purified from the tissue using the Trisure method (Bioline,



**Fig. 2** Deletion of *nlrp3* in mice prevents RS-induced inflammasome activation. **a** Quantification of *nlrp3* and IL-1 $\beta$  mRNA in PFC and hippocampus from *nlrp3*<sup>+/+</sup> and *nlrp3*<sup>-/-</sup> submitted or not to RS. **b**

Quantification of active IL-1 $\beta$  (p17) protein levels. RS induced increases levels of adenosine (**c**) and ATP (**d**) in hippocampus and PFC. All results are showed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p$  < 0.001 ( $N$  = 10 for each group)

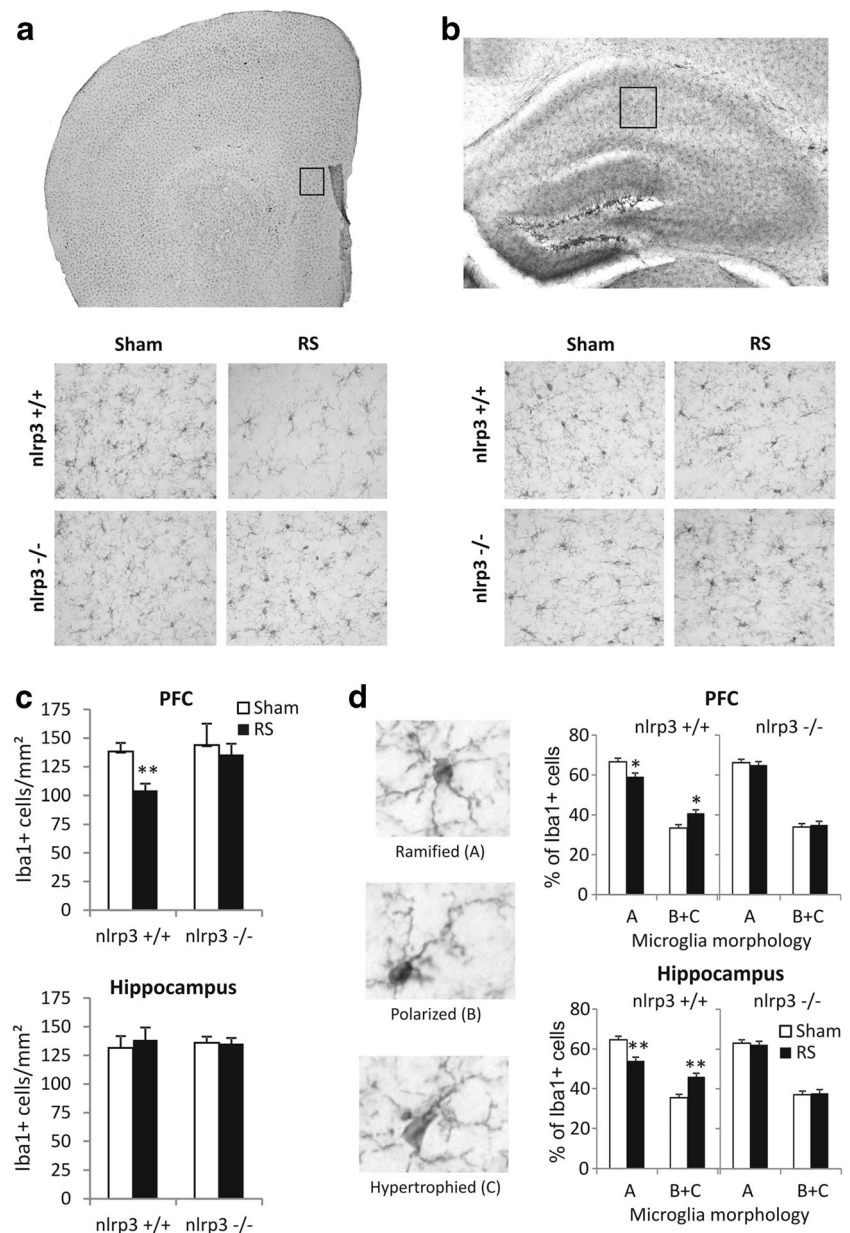
London, UK), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was determined spectrophotometrically and to avoid genomic DNA contamination; 1 µg of the total RNA from each sample was incubated for 5 min at 42 °C with gDNA wipeout buffer (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden, Germany). RNA samples were subsequently reverse transcribed to cDNA using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The thermal cycling conditions used were denaturation at 95 °C for 20 s, 40 cycles of priming at 54 °C for 20 s, and elongation at 72 °C for 20 s. The NLRP3 (NM\_145827.3) and IL-1β (NM\_008361.3) primers were used, as well as beta-actin primers as an internal control (NC\_000071). All reactions were performed in duplicate, and reaction mixes without RNA were used as negative controls in

each run. The absence of genomic DNA contamination was confirmed by setting up control reactions of RNA that had not been reverse transcribed. The fold change in the expression of the genes of interest was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### Immunohistochemistry and Histological Analysis

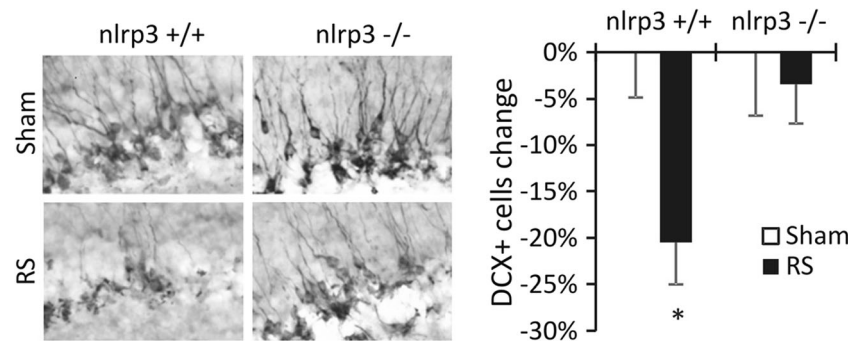
For immunohistochemistry (IHC), mice from each experimental group were anesthetized and perfused with saline, and their brain was removed and fixed by immersion for 24 h at 4 °C in 4 % paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline (PBS). The tissue was then cryoprotected in 30 % sucrose-PBS for 2 days at 4 °C, and coronal brain sections (50 µm) were then processed for free-

**Fig. 3** Deletion of *nlrp3* in mice impairs RS-induced microglia activation in the hippocampus and PFC. Microglial cells and neurogenesis were assessed by immunohistochemistry against Iba1 and DCX in brain tissue from *nlrp3*<sup>+/+</sup> and *nlrp3*<sup>-/-</sup> mice subjected to RS over 30 days or not. **a, b** Representative low magnification microphotograph of the PFC (**a**) and hippocampus (**b**) and high magnification images of each experimental group. In both cases, the box in the low magnification images of the PFC and hippocampus represents the region quantified. In the low magnification image of the hippocampus, immature DCX<sup>+</sup> cells are in *black* and microglia are in *gray*. **c** The density of microglial cells was quantified in the PFC and rostral hippocampus. **d** Microglial activation was assessed on the basis of morphology: Polarized and hypertrophic microglia cells are considered as activated. The percentage of each microglial cell type in each experimental group was represented: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, and \*\*\**p*<0.001 (*N*≥3 for each experimental group)





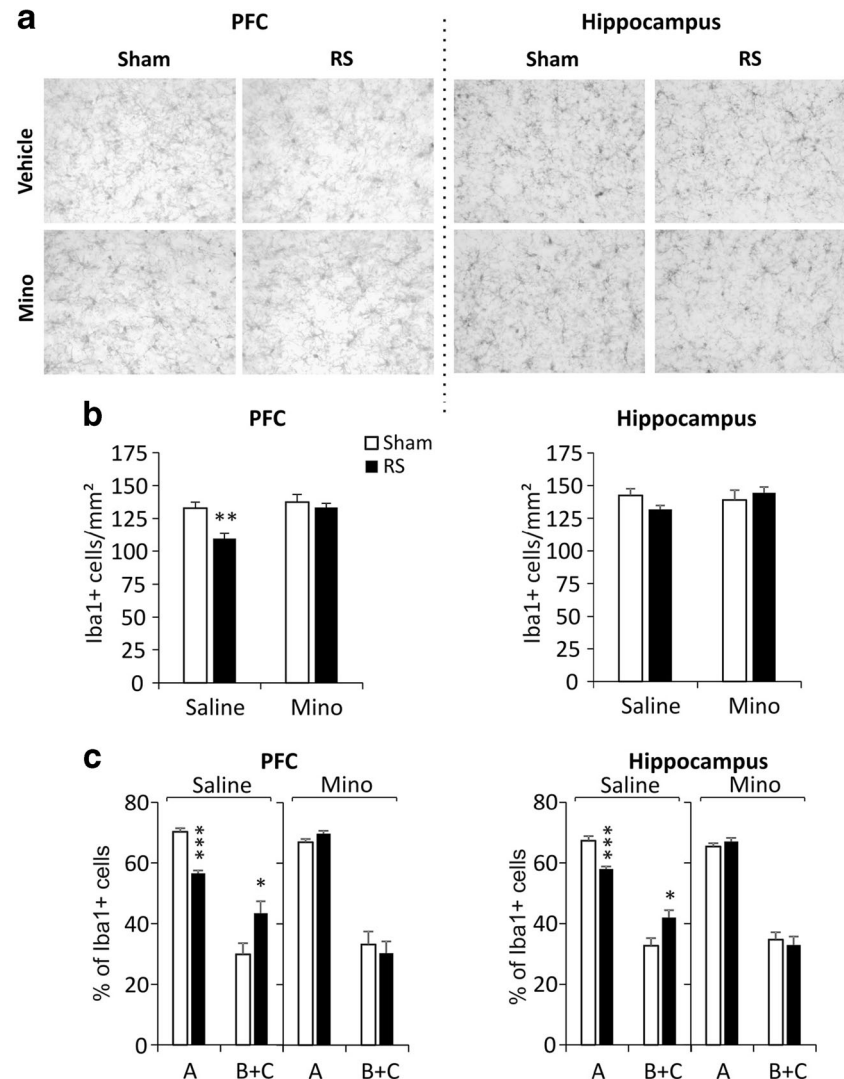
**Fig. 4** Genetic deletion of *nlrp3* prevents the impaired neurogenesis induced by RS. Hippocampal adult neurogenesis was evaluated through the DCX<sup>+</sup> cells in the dentate gyrus. Changes in DCX<sup>+</sup> cell density relative to the sham control group are shown: \* $p < 0.05$  ( $N \geq 3$  for each experimental groups)



floating IHC to detect Iba1 (1:1000, Wako Chemical, USA) and doublecortin (DCX, 1:500 [sc-8066], Santa Cruz Biotechnology). Antibody staining for IHC was visualized with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diaminobenzidine. To minimize variability, at least two sections from the rostral hippocampus (from -1.58 to -2.06 mm with respect to Bregma) or prefrontal cortex (1.94

to 1.70 mm with respect to Bregma) were analyzed per mice ( $n = 4$  mice per group) under a bright-field DMRB RFY HC microscope (Leica). For DCX cells, in each section, the total number of positive cells in the entire dentate gyrus was quantified using ImageJ software (downloaded as a free software package from the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

**Fig. 5** Minocycline treatment inhibits the microglial activation induced by RS. **a** High magnification images of the PFC and hippocampus from each experimental group. **b, c** Subchronic treatment with Mino blocked the RS-induced alterations in microglial cell number (**b**) and microglia activation (**c**) in the PFC and hippocampus: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  ( $N \geq 6$  per experimental group)



[download.html](#)). To determinate microglia activation, we used the cell counter application of ImageJ, and the density of ramified, polarized, and hypertrophied Iba1 positive cells was counted in six images (40× magnification) from each hippocampus and PFC.

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS package for Windows (SPSS, Chicago, IL). Unless otherwise indicated, the data represent the mean  $\pm$  SEM. The effects produced by RS on measures from the different behavioral tests or biological parameters were evaluated with Tukey's tests. However, when more than one factor was included in the analysis, the main and interaction effects were evaluated with two-way repeated measures ANOVA. In these cases, Student's *t* tests were also applied for post hoc comparisons. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

To study the role of the inflammasome in depressive-related behaviors induced by stress, we submitted mice to RS over 30 days. This protocol induced depressive-related behaviors that were evident in *nlrp3*<sup>+/+</sup> mice through the sucrose preference test ( $p < 0.01$ ), the forced swimming test ( $p < 0.001$ ), and in social interaction tests ( $p < 0.001$ ) and by a reduction in food intake (Fig. 1a–d). Interestingly, these behavioral alterations were not detected in *nlrp3*<sup>−/−</sup> mice (Fig. 1a–d). Indeed, it was noteworthy that in *nlrp3*<sup>+/+</sup> mice submitted to RS, there was a significant increase in NLRP3 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in the PFC and hippocampus ( $p < 0.001$ ; Fig. 2a), as well as enhanced IL-1 $\beta$  protein maturation (Fig. 2b). RS also increased the amount of adenosine in the PFC and hippocampus (Fig. 2c), a key regulator of inflammasome activity [14], with a consequent increment in ATP levels in both these brain areas (Fig. 2d). Interestingly, no such increase in NLRP3, IL-1 $\beta$ , and ATP levels were produced in *nlrp3*<sup>−/−</sup> mice following RS (Fig. 2a–d).

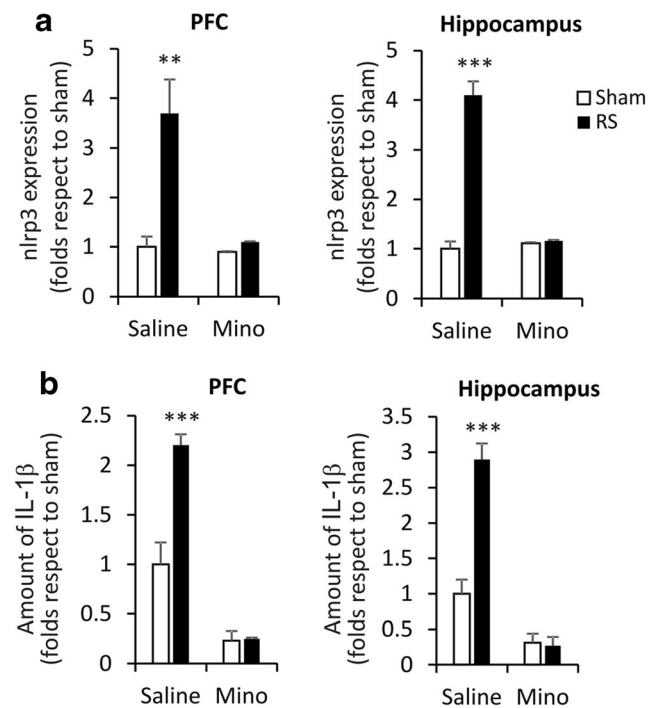
Recently, microglia has been implicated in the development of depressive-like behaviors and neuroinflammation [15, 16]. Our study revealed that chronic RS decrease microglial cell density, as reflected by the Iba1<sup>+</sup> cells in the PFC of *nlrp3*<sup>+/+</sup> mice ( $138.33 \pm 7.51$  in the controls and  $104.44 \pm 5.71$  in mice subjected to RS;  $t(8) = 3.66$ ,  $p = 0.006$ ; Fig. 3a–c). However, RS appeared to provoke microglial activation, evident as an increase in the percentage of polarized and hypertrophic Iba1<sup>+</sup> cells in the PFC and hippocampus of *nlrp3*<sup>+/+</sup> mice ( $t(8) = 2.96$ ,  $p = 0.018$  for PFC and  $t(8) = 4.21$ ,  $p = 0.002$  for hippocampus; Fig. 3d). Interesting, all this alterations in microglial parameter found in PFC and hippocampus of *nlrp3*<sup>+/+</sup> submitted to RS were not observed in *nlrp3*<sup>−/−</sup> mice after the same manipulation. As microglia activation is a negative regulator of adult hippocampal neurogenesis [17–19]

and adult hippocampal neurogenesis has been associated with depressive behaviors [20], we studied the number of immature DCX<sup>+</sup> neurons in the hippocampal dentate gyrus as neurogenesis marker. There was an  $\sim 20\%$  decrease in the number of DCX expressing cells in *Nlrp3*<sup>+/+</sup> mice submitted to RS ( $t(8) = 3.06$ ,  $p = 0.015$ ; Fig. 4), which was not observed in mice lacking NLRP3; moreover, these latter mice did not display any alteration in either microglia density or activation as a result of RS.

Finally, to assess the role of microglia in inflammasome activation and the induction of stress-induced depression, we administrated minocycline (Mino) to the mice, the most common inhibitor of microglial activation. Subchronic treatment with Mino prevented the RS-dependent microglial activation (Fig. 5a–c) and the increase in inflammasome expression and activity in the PFC and hippocampus (Fig. 6a, b). Consequently, mice submitted to RS that received Mino did not show any impairment in neurogenesis (Fig. 7) or depressive-like behavior in the forced swimming test (Fig. 8).

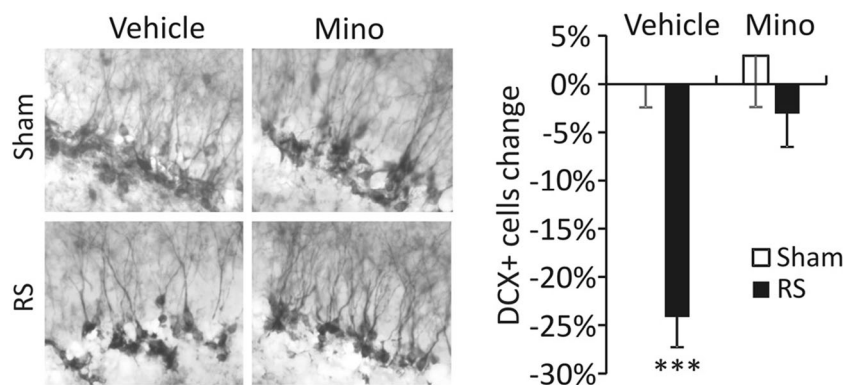
## Discussion

The inflammasome has emerged as an unexpected sensor for metabolic danger and stress [1, 7], and indeed, it has been



**Fig. 6** Minocycline treatment inhibits the appearance of neuroinflammation markers induced by RS. **a** The expression of *nlrp3* and IL-1 $\beta$  mRNA in the PFC and hippocampus of sham controls or mice subjected to RS in the presence or absence of Mino. **b** Changes in active IL-1 $\beta$  in the PFC and hippocampus of the sham control or the mice subjected to RS in the presence or absence of Mino administration: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ;  $N = 7$  mice per experimental groups

**Fig. 7** Minocycline treatment blocks the RS-induced impairment of neurogenesis. Changes in the density of DCX<sup>+</sup> cells in the hippocampus of sham control or mice subjected to RS in the presence or absence of Mino:  $p < 0.001$  ( $N \geq 6$  mice per group for histological assays)



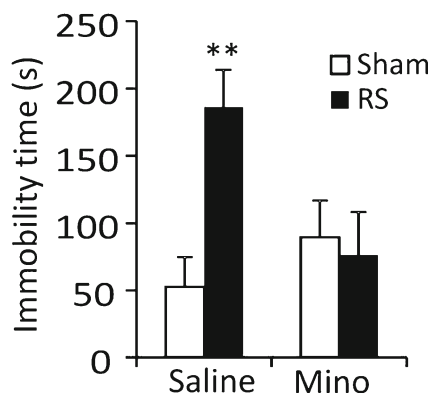
implicated in the development of major diseases such as gout, type 2 diabetes, and obesity-induced insulin resistance [21]. Moreover, the NLRP3 inflammasome is increasingly suspected to play a major role in other human pathologies such as cancer, cardiovascular diseases, and other systemic diseases [21], all of which are co-morbid systemic illnesses related to depression [1].

In the present study, we have assessed the implication of the NLRP3 inflammasome and microglial activation in stress-dependent depressive behavior. Depression is widely accepted to be caused by neurochemical imbalances in different regions of the brain, particularly in the PFC and hippocampus that are known to control mood, anxiety, cognition, and fear [22]. Impaired hippocampal neurogenesis and microglial activation seem to be associated with the development of stress-dependent depressive behaviors [20, 23]. Accordingly, RS shows dentate gyrus adult immature neuron impairment, suggesting neurogenesis decrease, in correlation with depressive behavior. The exact effect of stress on the different stages of neurogenesis is still unclear, although increased levels of IL-1 $\beta$  in the hippocampus may be responsible for the impaired neurogenesis, as already described [5, 19, 24]. This hypothesis was also suggested by the absence of stress-induced impairment of neurogenesis and depression in the *nlrp3*<sup>-/-</sup> mice and in minocycline-treated mice, probably as a consequence of the

decreased IL-1 $\beta$  mRNA and peptide basal levels and the lack of stress-induced IL-1 $\beta$  production.

Microglial cells are ubiquitous throughout the brain, and the NLRP3 inflammasome is constitutively expressed in macrophages and microglia, the resident macrophages in the CNS [11]. Moreover, recent studies demonstrated that stress induces microglial activation in several regions of the CNS [16, 23]. Our results show that the NLRP3 inflammasome is activated by RS together with an important increment in ATP, one of the most important stimuli of inflammasome activation [14] and an inducer of microglial activation [25, 26]. Genetic and pharmacological approaches have shown that microglial NLRP3 inflammasome activation mediates the IL-1 $\beta$ -related CNS inflammation induced by chronic stress [11]. Here, we demonstrate that microglial activation required functional NLRP3 and that activation of the NLRP3 inflammasome plays a pivotal role in the development of stress-dependent depressive behaviors in mice. Genetic depletion of the NLRP3 inflammasome or pharmacological inhibition of microglia activation block the reduced number of hippocampal immature neurons and impairs the microglial activation and depression-like behavior induced by repetitive stress. While the microglial changes in the PFC are apparently contradictory observations, a decrease in microglial number and an increase in IL-1 $\beta$  expression, this may indicate that activated microglial cells are the principal source of the IL-1 $\beta$  produced [15].

In conclusion, our results together indicate that activation of NLRP3 plays a pivotal role in the development of depressive-like behavior and in the cellular and molecular alterations associated with depression. These data suggest that the microglial inflammasome is probably a central element in the development of stress-induced depressive behaviors, and thus, the NLRP3 inflammasome may represent a novel therapeutic target to manage depression.



**Fig. 8** Minocycline treatment prevents RS-induced depression. The effect of Mino on RS-induced depression was determined as the immobility time in the forced swimming test:  $**p < 0.01$  ( $N \geq 6$  mice per group)

**Acknowledgments** We thank Dr. M. Sefton for editorial assistance. This work has been supported by Grupo de Investigación Junta de Andalucía CTS113, Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0036-2014), Fundación Ramón Areces, and the Departamento Governamental de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DGICYT: BFU2008-01,552 and BFU2011-27,207).

**Conflict of Interest** The authors declared that they have no competing interests.

## References

- Iwata M, Ota KT, Duman RS (2013) The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun* 31:105–114
- Kessler RC (2012) The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am* 35:1–14
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE et al (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *J Am Med Assoc* 289:3095–3105
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL (2010) A metaanalysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67:446–457
- Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS (2010) Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2669–2674
- Müller N (2014) Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation* 21:123–130
- Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS (2011) Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol Rev* 243:152–162
- Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT (2014) Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* 8:315
- Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, Núñez-Vasco J, Sánchez-Alcazar JA, Fernández-Rodríguez A, Cordero MD (2013) NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 36:111–117
- Zhang Y, Liu L, Peng YL, Liu YZ, Wu TY, Shen XL, Zhou JR, Sun DY et al (2013) Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther* 20:119–124
- Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD (2014) Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain Behav Immun* S0889–1591:00120–00122
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237–241
- Chiu GS, Darmody PT, Walsh JP, Moon ML, Kwakwa KA, Bray JK, McCusker RH, Freund GG (2014) Adenosine through the A2A adenosine receptor increases IL-1b in the brain contributing to anxiety. *Brain Behav Immun* S0889–1591:00140–00148
- Ouyang X, Ghani A, Malik A, Wilder T, Colegio OR, Flavell RA, Cronstein BN, Mehal WZ (2013) Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A<sub>2</sub>A receptor and the HIF-1 $\alpha$  pathway. *Nat Commun* 4:2909
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553
- Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R (2014) Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry* 19: 699–709
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632–13637
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158: 1021–1029
- Koo JW, Duman RS (2008) IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:751–756
- Banasr M, Duman RS (2011) Cell growth and survival in the pathophysiology and treatment of depression. *Curr Opin Mol Cell Neurosci* 91:333–338
- Menu P, Vince JE (2011) The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 166:1–15
- Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN (2014) Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev* 38:173–192
- de Pablos RM, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Muñoz MF, Machado A, Venero JL (2014) Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation* 11:34
- Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, Thuret S, Price J et al (2012) Interleukin-1 $\beta$ : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 37:939–949
- Inoue K (2008) Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci* 65:3074–3080
- Hanamsagar R, Torres V, Kielian T (2011) Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *J Neurochem* 119:736–748



Manuscript Number: BBI-D-15-00540

Title: Differential effect of antidepressant treatment in the inhibition of NLRP3-inflammasome in Major depressive disorder

Article Type: Full Length Article

Keywords: Major Depressive Disorder, antidepressants, NLRP3-inflammasoma

Corresponding Author: Prof. Mario D. Cordero,

Corresponding Author's Institution: Research Laboratory, Oral Medicine Department, University of Sevilla, Sevilla, Spain

First Author: Elisabet Alcocer-Gómez

Order of Authors: Elisabet Alcocer-Gómez; Nieves Casas-Barquero; Samuel L. Romero-Guillena; Matthew R. Williams; Diego Cañadas-Lozano; Pedro Bullón; José A. Sánchez-Alcazar; Mario D. Cordero

**Abstract:** Major Depressive Disorder (MDD) is a prevalent disease whose pathogenic mechanism remains elusive. In recent years an important role has been attributed to neuro-inflammation, specifically the NLRP3-inflammasome complex, in the pathogenesis of MDD, and therefore immunomodulation has emerged as a potential key pathway in the treatment of this disorder. In this respect our study proposes the evaluation of commonly antidepressants (fluoxetine, paroxetine, mianserin, mirtazapine, venlafaxine, desvenlafaxine, amitriptyline, imipramine or agomelatine) in the NLRP3 inflammasome complex in an in vitro model of THP-1 cells stimulated by ATP in a stress-induced depressive behavioral animal model and MDD patients. Two hundred and fourteen patients MDD patients were selected for this study. The inflammasome activation was studied by western blot and real-time PCR of NLRP3 and serum levels of IL-1 $\beta$  and 18. Antidepressant induced an important inflammasome inhibition by IL-1 $\beta$  and 18 release reduction and decrement of NLRP3 and IL-1 $\beta$  (p17) protein expression. This effect was also observed in stress-induced depressive behaviour and inflammasome activation in C57Bl/6 mice in vivo. The experimental data observed in MDD patients treated with the same antidepressants, with an interesting negative correlation between IL-1 $\beta$  and serotonin levels from MDD patients. A large body of evidence suggests an anti-inflammatory effect of some antidepressants showed by IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . Altogether our data suggests NLRP3-inflammasome as a biomarker system to evaluate the antidepressant treatment response in MDD patients. Monitoring the NLRP3 expression levels and/or IL-1 $\beta$ /IL-18 release could help to the antidepressant election.

Suggested Reviewers: Ognjen Culic  
oculic@pharma.hr

Owen Wolkowitz  
owen.wolkowitz@ucsf.edu

Ann Gardner

agtorndal@odenhall.se

Opposed Reviewers: Michael Maes  
Conflict of interest



**K. Kelley, Editor-in-Chief**  
**Brain, Behavior, and Immunity**

September 14, 2015

Dear Editor,

We would like to submit our manuscript: "*Differential effect of antidepressant treatment in the inhibition of NLRP3-inflammasome in Major depressive disorder*" to be considered for publication in Brain, Behavior, and Immunity, in form of an *ORIGINAL ARTICLE*.

Major Depressive Disorder (MDD) is a very prevalent disease, which despite the fact that it affects up to 10% of the general population worldwide, its pathogenic mechanism remains elusive. There are some hypotheses and pilot studies suggesting that cytokines may play an important role in MDD. In this sense, pharmacological treatment about neuroinflammation has been studied.

In this study we have described the effects of several important antidepressant in the inhibition of NLRP3 inflammasome complex in blood cells from MDD patients, in vitro model of inflammasome activation and stress-induced animal model of depression. Accordingly, we propose NLRP3-inflammasome as a biomarker system to evaluate the antidepressant treatment response in MDD patients. Monitoring the NLRP3 expression levels and/or IL-1 $\beta$ /IL-18 release could help to the antidepressant election.

We have included the response to all comments from the reviewers. We want to thank the positive comments from reviewers.

I hereby state:

1. That the submitting author has the written consent from all authors to submit the manuscript and that all authors accept complete responsibility for the contents of the manuscript
2. That the manuscript is not currently under consideration elsewhere and the work reported will not be submitted for publication elsewhere until a final decision has been made as to its acceptability by the Journal
3. That the manuscript is truthful original work
4. All the Authors declare that no conflict of interest exists for any of them.

Yours sincerely

Mario D. Cordero,  
IBiS Institute of Biomedicine of Seville, Universidad de Sevilla,  
C/ Calle Antonio Maura Montaner s/n, 41013 –Sevilla, SPAIN.  
Tel.: +34 954 481120  
Fax: +34 954 486784  
Email: [mdcormor@us.es](mailto:mdcormor@us.es)

## Highlights

NLRP3-inflammasome is implicated in the pathophysiology of Major depressive disorder

Antidepressants has an inhibitory effect of NLRP3-inflammasome

NLRP3 could be a biomarker to evaluate the antidepressant treatment response in patients

# Differential effect of antidepressant treatment in the inhibition of NLRP3-inflammasome in Major depressive disorder

Elísabet Alcocer-Gómez<sup>1</sup>, Nieves Casas-Barquero<sup>2</sup>, Samuel L. Romero-Guillena<sup>2</sup>, Matthew R. Williams<sup>3</sup>, Diego Cañadas-Lozano<sup>4,5</sup>, Pedro Bullón<sup>4,5</sup>, José Antonio Sánchez-Alcazar<sup>1</sup>, Mario D. Cordero<sup>4,5†</sup>

<sup>1</sup>Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, 41013, Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Dpto. Psiquiatría, Hospital Universitario Virgen Macarena, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Spain.

<sup>3</sup>Rob Steiner Unit, Hammersmith Hospital, London, W12 0NN, UK.

<sup>4</sup>Research Laboratory, Oral Medicine Department, University of Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>5</sup> IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital VirgindelRocío-CSIC-University of Seville Spain

**Running Title:** Inflammasome activation and antidepressant drugs

## † Corresponding Author:

Mario D. Cordero,  
IBiS Institute of Biomedicine of Seville, Universidad de Sevilla,  
C/Calle Antonio Maura Montaner s/n, 41013 –Sevilla, SPAIN.  
Tel.: +34 954 481120  
Fax: +34 954 486784  
Email: [mdcormor@us.es](mailto:mdcormor@us.es)

**Abstract**

Major Depressive Disorder (MDD) is a prevalent disease whose pathogenic mechanism remains elusive. In recent years an important role has been attributed to neuro-inflammation, specifically the NLRP3-inflammasome complex, in the pathogenesis of MDD, and therefore immunomodulation has emerged as a potential key pathway in the treatment of this disorder. In this respect our study proposes the evaluation of commonly antidepressants (fluoxetine, paroxetine, mianserin, mirtazapine, venlafaxine, desvenlafaxine, amitriptyline, imipramine or agomelatine) in the NLRP3 inflammasome complex in an *in vitro* model of THP-1 cells stimulated by ATP in a stress-induced depressive behavioral animal model and MDD patients. Two hundred and fourteen patients MDD patients were selected for this study. The inflammasome activation was studied by western blot and real-time PCR of NLRP3 and serum levels of IL-1 $\beta$  and 18. Antidepressant induced an important inflammasome inhibition by IL-1 $\beta$  and 18 release reduction and decrement of NLRP3 and IL-1 $\beta$  (p17) protein expression. This effect was also observed in stress-induced depressive behaviour and inflammasome activation in C57Bl/6 mice *in vivo*. The experimental data observed in MDD patients treated with the same antidepressants, with an interesting negative correlation between IL-1 $\beta$  and serotonin levels from MDD patients. A large body of evidence suggests an anti-inflammatory effect of some antidepressants showed by IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . Altogether our data suggests NLRP3-inflammasome as a biomarker system to evaluate the antidepressant treatment response in MDD patients. Monitoring the NLRP3 expression levels and/or IL-1 $\beta$ /IL-18 release could help to the antidepressant election.

**Keywords:** Major Depressive Disorder, antidepressants, NLRP3-inflammasoma

## Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a severe and potentially debilitating psychiatric illness that is characterized by a significant change in mood accompanied by other symptoms such as low self-esteem, anhedonia, disrupted sleeping, eating and cognition. It has been estimated to be the second major illness in social and economic burden by 2020, exceeding all diseases except ischemic heart disease (Greden, 2001; Murray and Lopez, 1997). Despite the fact that it affects up to 10% of the general population worldwide, its pathogenic mechanism remains elusive (Kessler, 2012). Antidepressant therapy is an essential treatment of major depression. However, despite the increasing variety of antidepressants currently available, only a third of patients respond adequately to treatment, and up to half of them relapse within 1 year or suffer from severe side effects (Thase, 2006). A number of studies have investigated the use of genetic markers to predict therapy outcome, i.e. antidepressant drug response, in major depression.

Accumulating evidence suggests the involvement of inflammatory processes and cytokines in the pathophysiology of MDD and resistance to antidepressant treatment (Wang et al., 2011). In certain forms of depression, the increased interleukin-1 $\beta$  signaling has shown to drive the resistance to SSRI's (Pineda et al., 2012). Interestingly, IL-1 $\beta$  is one of the two known cytokines, together with IL-18, activated by the inflammasome complex. The inflammasome is a protein complex that comprises an intracellular sensor, typically a Nod-like receptor (NLR), the precursor procaspase-1 and the adaptor ASC. Inflammasome activation leads to the maturation of caspase-1 and the processing of its substrates, IL-1 $\beta$  and IL-18 (Leemans et al., 2011). Of all the NLRs, NLRP3 is activated by the most diverse array of danger signals. Recently, the activation of NLRP3 inflammasome in blood mononuclear cells (BMCs) from depressive patients (Zhang et al., 2013), and lipopolysaccharide-induced mice

depressive-like behaviors (Alcocer-Gómez et al., 2013) has been demonstrated suggesting this findings a new insight into the pathogenesis of MDD.

We hypothesize that antidepressant can to induce a low modulation of inflammasome complex suggesting a new therapeutic target for the prevention and treatment of MDD. Furthermore the inflammasome complex could be a biomarker to evaluate the effectiveness of and resistance to antidepressants. We evaluate this hypothesis using an *in vitro* model of inflammasome activation with ATP in which, we will use several common antidepressants, and then extrapolate our *in vitro* data in patients treated with these antidepressants.

## Material and methods.

### Ethical Statements

Written informed consent and the approval of the ethical committee of University of Seville were obtained prior to study, according to the principles of the Declaration of Helsinki.

### Patients

Twenty patients with major depression in first episode without treatment with a DSM-IV diagnosis of melancholic depression (DSM-IV code: F33) were collected from the Service of Psychiatry of Hospital Virgen Macarena, in Seville, Spain. The diagnosis was established by personal interview according to diagnostic criteria of DSM-IV. In parallel, we select one hundred ninety four patients treated with fluoxetine (20 patients), paroxetine (17 patients), mianserin (18 patients), mirtazapine (15 patients), venlafaxine (20 patients), desvenlafaxine (21 patients), amitriptyline (20 patients), imipramine (20 patients) or agomelatine (18 patients) in order to evaluate the effect of the



antidepressant in inflammasome markers. Any suicide attempts were registered in all patients. All patients were recruited after a depressive episode. Patients not treated were included consecutively after diagnosis but before any antidepressant medication regimen was started. There were low numbers of men included in this study because of the low number of men affected by major depression in the Service of Psychiatry of Hospital Virgen Macarena at the time of the study. Patients on antidepressants treatment were stable as confirmed by follow-up outpatient clinics. All patients followed chronic antidepressants monotherapy treatment for a minimum of 6 months at doses considered clinically effective by their physicians. These doses were highly homogeneous in the different antidepressants (Table 2). Patients without treatment had not taken medication before of the study and they were selected in the first episode. All patients were at least 18 years of age (age and sex in Table 1), and either they or their legal representatives gave informed consent to be included in the study. Blood samples from twenty healthy volunteers (males/5, females/15) were included in the study matching the age range, gender, ethnicity, and demographics of the recruited patients. The protocol has been carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethical committee of our institution.

### ***In vitro* experiments**

THP-1 cells were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, an antibiotic/antimycotic solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and 10% fetal bovine serum. THP-1 cells were cultured with 5mM ATP during 12h with and without 1µM fluoxetine, paroxetine, mianserin, mirtazapine, venlafaxine, desvenlafaxine, amitriptyline, imipramine or agomelatine.

### **Serum and blood mononuclear cells isolation**

Coagulated and non-coagulated bloods were collected after 12-hours fasting, between 8:00 and 10:00 AM from patients and healthy age- and sex-matched control subjects, centrifuged at 3800 g for 5 min, and serum was stored at – 80 °C until testing. BMCs were purified from heparinized blood by isopycnic centrifugation using Histopaque-1119 and Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### **Immunoblotting**

Western blotting was performed using standard methods. After protein transfer, the membrane was incubated with various primary antibodies diluted 1:1000, and then with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase at a 1:10000 dilution. Specific protein complexes were identified using the Immun Star HRP substrate kit (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Anti-GAPDH monoclonal antibody from Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Anti-NLRP3 antibody from Adipogen (San Diego, USA). Anti-IL-1 $\beta$  (p17) antibody from (Santa Cruz Biotechnology).

### **IL-1 $\beta$ and IL-18 levels**

IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in serum or culture mediums were assayed in duplicates by commercial ELISA kits (MyBioSource, Inc., CA, USA).

### **Serotonin levels**

Serotonin levels in cells were assayed in duplicates by commercial ELISA kits (GenWay, San Diego, CA, USA)

### **Real-time quantitative PCR**

The expression of NLRP3 gene was analyzed by SYBR Green quantitative PCR using mRNA extracts of BMCs from patients and controls. Total cellular RNA was purified from BMCs using the Trisure method (Bioline, London, UK), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined spectrophotometrically. In order to avoid genomic DNA contamination, one microgram of total RNA from each sample was incubated in gDNAwipeout buffer (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen. Hilden, Germany) at 42 °C for 5 min. RNA samples were subsequently retrotranscribed to cDNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen. Hilden, Germany). The thermal cycling conditions used were: denaturation at 95°C for 20 s, alignment at 54°C for 20 s and elongation at 72°C for 20 s, for 40 cycles. NLRP3 primers were: 5'-GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA -3' (forward) and 5'-GCTGTCTTCCTGGCATATCACA -3' (reverse). We used a second pair of beta-actin primers as an internal control; forward: 5'- CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3' and reverse: 5'- ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'. All reactions were performed in duplicate. Reaction mixtures, without RNA, were used as negative controls in each run.

Absence of genomic DNA contamination was confirmed by setting up control reactions that do not contain reverse transcriptase. Fold changes in the expression of genes of interest were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### **Behavioral assays**

Behavioral analyses were performed in a room with constant controlled noise and light. The testing apparatus was cleaned with 70% ethanol (PanreacQuímica S.A.U) between trials to eliminate any influence of animal odor on the exploratory behavior. All animal in each group was tested.

Eight-week-old male C57/BL6/J mice weighing 25-30 g were maintained on a 12 h light/dark cycle. To avoid potential litter effects, each group came from different litters. After testing, the mice were anesthetized with CO<sub>2</sub> and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected for immediate biochemical analysis. For the antidepressants treatment, mice were randomly assigned to stressed saline-treated, stressed drugs-treated, and no stressed-no treated, in which the mice received daily intraperitoneal injections of antidepressants (10mg/kg: Sigma-Aldrich) or of the vehicle alone (PBS). The pharmacological treatment was applied after 30 days of restraint stress.

### **Immobilization stress**

Briefly, mice were confined in perforated 50 mL horizontal conical tubes for 2 h each day over a total of 30 days. During the 2 h period of stress by immobilization, both the stressed and control groups were deprived of food and water, and thereafter, food and water was provided ad libitum and its intake was monitored daily. Restraint stress was performed at the same time each day and it was not performed on the day of sacrifice.

### **Forced swimming test**

The forced swimming test (FST) employed was essentially similar to that described elsewhere. Briefly, mice were placed individually in a transparent 2 l glass cylinder (19 cm tall) filled to a depth of 13 cm with water at 23 °C, and they were left there for 15 min. 24h later, the mice were subjected to one 6 min session of swimming in water and they were scored off-line by an observer blind to the treatment considering minutes two to six of the session. Immobility was defined as the minimal movement possible to stay afloat.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed using the SPSS package for Windows (SPSS, Chicago, IL). Unless otherwise indicated, data represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis of differences observed between numeric parameters of all groups was performed by one-way ANOVA using an all pairwise multiple comparison procedure (Tukey's test) for correction. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses included Pearson's correlations between IL-1 $\beta$  respect to serotonin levels.

## Results

### Antidepressants reduces NLRP3-inflammasome activation in vitro

After inflammasome activation in THP-1 cells (a human monocytic cell line) by treatment with 5mM ATP during 12h we studied the effect of the co-treatment with Fluoxetine and paroxetine (SSRIs), Mianserin and Mirtazapine (TeCAs), Venlafaxine and Desvenlafaxine (SNRIs), Amitriptyline and Imipramine (TCAs) and Agomelatine (Figure 1). All drugs were used 1 $\mu$ M to approach clinically relevant blood levels of these antidepressants. IL-1 $\beta$  and IL-18 release induced by ATP treatment was reduced by all antidepressants; however we observed the most significant reduction about IL-1 $\beta$  with Mirtazapine (TeCA) (76%) and Fluoxetine (SSRI) (67%). Mianserin (TeCA) and Agomelatine induced a reduction about 61% of IL-1 $\beta$ , Imipramine 59% and Amitriptyline (TCAs), Paroxetine (SSRI), Venlafaxine and Desvenlafaxine (SNRIs) induced about 51% of reduction (Figure 2A). Similar results were observed in IL-18 levels (Figure 2B), so it is interesting that our results did not show a correlation between families of antidepressants. As IL-1 $\beta$  and IL-18 are the downstream products from inflammasome activation we studied the NLRP3 and active form of IL-1 $\beta$  (p17) protein expression after antidepressants treatment with respect to ATP treatment. The results showed all antidepressants prevented increased NLRP3 and active form of IL-1 $\beta$

(p17) protein over-expression levels induced by ATP in THP-1 cells (Figure 3A and B), continuing the trend observed in IL-1 $\beta$  and IL-18.

In order to study the effects of antidepressants in inflammasome activation in an *in vivo* model and according with *in vitro* results we induced an animal model of depressive-related behaviors by stress treatment. This was performed in mice using restraint stress (RS) over 30 days. The protocol induced depressive-related behaviors in stressed mice through the forced swimming test ( $P < 0.001$ ) (Figure 4A). Mice submitted to RS showed a significant increase in IL-1 $\beta$  serum levels ( $P < 0.001$ ) compared to controls (Figure 4B).

### **Antidepressants reduces NLRP3-inflammasome activation in patients with MDD**

According to these results in *in vitro* and *in vivo* models, we have evaluated the effect of antidepressants in several depressive patients treated with all assayed antidepressants *in vitro*. Two hundred and fourteen patients with MDD were included in the study. Table 1 show data according to age and sex distribution of the patients. The patients were distributed according to pharmacological treatment: Non-treated (20 patients), fluoxetine (20 patients), paroxetine (17 patients), mianserin (18 patients), mirtazapine (15 patients), venlafaxine (20 patients), desvenlafaxine (21 patients), amitriptyline (20 patients), imipramine (20 patients) or agomelatine (18 patients). According to our experimental data, antidepressant induced an important reduction of inflammasome activation by an inhibition of IL-1 $\beta$  and IL-18 (Figure 5A and B). Furthermore, serum results were accompanied by a significant decrement in NLRP3 mRNA expression in BMCs (Figure 5C).

Interestingly, in a representative sample, IL-1 $\beta$  serum levels showed high negative correlation with serotonin BMCs levels of treated MDD patients (Figure 5D). This data

suggests that increased inflammasome levels may be a biological marker for antidepressant response in MDD.

## Discussion

Inflammasomes have an important role in innate immunity, but their aberrant activation is linked to chronic inflammatory diseases. Recently, inflammasomes have emerged as unexpected markers for metabolic danger and stress. Indeed it has been implicated in the development of major diseases such as gout, type-2 diabetes and obesity-induced insulin resistance. Moreover the NLRP3 inflammasome is increasingly suspected of playing a major role in other human pathologies such as cancer, cardiovascular diseases and other systemic diseases (Menu et al., 2011), all of which are comorbid systemic illnesses related with depression (Iwata et al., 2012). These findings have increased the urgency of finding inhibitors of inflammasomes as a therapeutic option. A large body of evidence suggests that MDD is accompanied by activation of inflammatory pathways, reflected by increased levels of inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  (Dowlati et al., 2010; Maes et al., 1993; Rawdin et al., 2012). However, it has been found that antidepressant treatment reduces serum levels of IL-1 $\beta$ , but not TNF $\alpha$  and IL-6, suggesting that IL-1 $\beta$  plays a major role in treatment response (Hannestad et al., 2011) and it can be used as a potential functional biomarker of depression (Schmidt et al., 2011). Because IL-1 $\beta$  is cytokine activated by the inflammasome complex, we could hypothesize the implication of inflammasome in the effectiveness of antidepressant treatment. In this sense, higher levels of proinflammatory cytokines have shown to predict lack of future response to antidepressants (Cattaneo et al., 2013). Recently, the Genome-based Therapeutic Drugs for Depression (GENDEP) study showed the utility of gene expression (blood mRNA) of several selected genes, including inflammatory genes to evaluate the antidepressant response (Cattaneo et al., 2013). Our study has shown a

1 potential inhibitor effect of different antidepressants upon IL-1 $\beta$  and IL-18 release in  
2 patients, cells and stress-induced depressive behaviors animal model. This cytokine  
3 release was accompanied by protein expression of the principal inflammasome stress  
4 inductor NLRP3 and a reduction of mRNA NLRP3 expression in MDD patients. This  
5 has implications for the utility of NLRP3 gene expression to evaluate the antidepressant  
6 response. Our results did not show a correlation between families of antidepressants and  
7 inflammasome reduction, showing a different inhibition grade with different drugs.  
8 From this finding our data support the idea of a personalized-medicine approach to the  
9 treatment of depression according to the personal grade of the inflammasome activation  
10 in the patients.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 We also show a negative correlation between serotonin content in cells (which cells?)  
26 and IL-1 $\beta$  release in the treated patients, which we can interpret as serotonin level  
27 recuperation according to inflammasome inhibition. As cytokines have been shown to  
28 alter neurotransmitter concentrations, resulting in a hypo-serotonergic response in several  
29 psychiatric process such as depression or obsessive-compulsive disorder (Réus et al.,  
30 2015; Rao et al., 2015). Research into the role of tryptophan degradation and the  
31 kynurenine pathway in the setting of inflammation has brought new insight into  
32 potential etiologies of MDD and could explain the data presented here.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Given the central importance attributed to neuroinflammation in the pathogenesis of  
46 MDD immunomodulation has emerged as a potential key pathway in the treatment of this  
47 disorder. We have tested several different antidepressants but the molecular mechanism  
48 by which antidepressants inhibit inflammasome complex remains elusive and could be  
49 due to different mechanisms. It is known that glial cells are a major source of CNS  
50 inflammatory cytokines (Ransohoff and Brown, 2012) and IL-1 $\beta$  is released primarily  
51 by microglia and macrophages (Mason et al., 2001). Recently microglia have shown to  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 be responsible for the NLRP3 inflammasome activation and mediator of IL-1 $\beta$ -related  
2 CNSinflammation (Pan et al., 2014). By this mechanism the regulatory effect in  
3  
4 microglia induced by antidepressant treatment could explain the inhibitory effect  
5  
6  
7 (Dubovický et al., 2014; Ramirez et al., 2015; Lee et al., 2015).  
8  
9

10 Our study shows results consistent with previous studies that report anti-inflammatory  
11  
12 effect of the different separate antidepressants and related to different cytokines. This is  
13  
14 the first study that shows a comparative effect of all different antidepressants in *in vitro*  
15  
16 and *in vivo* experiments, and the inflammasome complex activation in clinically  
17  
18 appropriate doses (Schulz et al., 2012; Horowitz et al., 2014).  
19  
20  
21  
22

23 However we are aware of some limitations of this study. Given the complexity of the  
24  
25 disease the reduced number of patients and the importance of a rapid clinical approach  
26  
27 of MDD patients, it is very complicated obtain samples in consistent conditions.  
28  
29 Furthermore we have not controlled several variables as food consumption and weight  
30  
31 loss that may have influenced the results. Therefore further analysis involving more  
32  
33 samples from MDD patients will be required to independently confirm our findings, and  
34  
35 currently our research group is working in this direction on the basis of the conclusions  
36  
37 of the exploratory work discussed in this article.  
38  
39  
40  
41  
42

43 In conclusion our study proposes NLRP3-inflammasome as a biomarker system to  
44  
45 evaluate the antidepressant treatment response in MDD patients. Monitoring the NLRP3  
46  
47 expression levels and/or IL-1 $\beta$ /IL-18 release could help to the antidepressant election.  
48  
49  
50

## 51 **Acknowledgments**

52 This work has been supported by Grupo de Investigacion Junta de Andalucía CTS113,  
53  
54  
55  
56  
57 Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0036-2014).  
58  
59

## 60 **Competing Interests**

61  
62  
63  
64  
65

The authors declared that they have no competing interests.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- Alcocer-Gómez, E., de Miguel, M., Casas-Barquero, N., Núñez-Vasco, J., Sánchez-Alcazar, J.A., Fernández-Rodríguez, A., Cordero, M.D., 2013. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun.* 36, 111-7.
- Cattaneo, A., Gennarelli, M., Uher, R., Breen, G., Farmer, A., Aitchison, K.J., Craig, I.W., Anacker, C., Zunsztain, P.A., McGuffin, P., Pariante, C.M., 2013. Candidate genes expression profile associated with antidepressants response in the GENDEP study: differentiating between baseline 'predictors' and longitudinal 'targets'. *Neuropsychopharmacology.* 38, 377-85.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L., 2010. A metaanalysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 67:446-457.
- Dubovický, M., Császár, E., Melicherčíková, K., Kuniaková, M., Račková, L., 2014. Modulation of microglial function by the antidepressant drug venlafaxine. *Interdiscip Toxicol.* 7, 201-7.
- Greden, J.F., 2001. The burden of disease for treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry.* 62 Suppl 16, 26-31.
- Hannestad, J., DellaGioia, N., Bloch, M., 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a metaanalysis. *Neuropsychopharmacology.* 36, 2452-2459.
- Horowitz, M.A., Wertz, J., Zhu, D., Cattaneo, A., Musaelyan, K., Nikkheslat, N., Thuret, S., Pariante, C.M., Zunsztain, P.A., 2014. Antidepressant compounds can be both

1 pro- and anti-inflammatory in human hippocampal cells.*Int J Neuropsychopharmacol.*  
2 31,18(3).  
3

4  
5 Iwata, M., Ota, K.T., Duman, R.S., 2013. The inflammasome: Pathways linking  
6 psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun* 31,105-14.  
7

8  
9  
10  
11 Kessler, R.C., 2012. The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am.* 35,1-14.  
12

13  
14 Lee, J.Y., Kang, S.R., Yune, T.Y., 2015. Fluoxetine prevents oligodendrocyte cell death  
15 by inhibiting microglia activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 32, 633-44.  
16

17  
18  
19  
20 Leemans, J.C., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., 2011. Sensing damage by the NLRP3  
21 inflammasome. *Immunol Rev.* 243,152-62.  
22

23  
24  
25  
26 Maes, M., Bosmans, E., Meltzer, H.Y., Scharpe, S., Suy, E., 1993. Interleukin-1 beta: a  
27 putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psychiatry.*  
28 150,1189-1193.  
29

30  
31  
32  
33  
34 Mason, J.L., Suzuki, K., Chaplin, D.D., Matsushima, G.K., 2001. Interleukin-  
35 1betapromotes repair of the CNS. *J. Neurosci.* 21, 7046–7052  
36

37  
38  
39  
40 Menu, P., and Vince, J.E., 2011. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the  
41 good, the bad and the ugly. *ClinExpImmunol.* 166:1-15.  
42

43  
44  
45  
46 Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. Alternative projections of mortality and disability by  
47 cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 349:1498-1504.  
48

49  
50  
51  
52 Pan, Y., Chen, X.Y., Zhang, Q.Y., Kong, L.D., 2014. Microglial NLRP3 inflammasome  
53 activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive  
54 rats. *Brain Behav Immun.* 41,90-100.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Pineda, E.A., Hensler, J.G., Sankar, R., Shin, D., Burke, T.F., Mazarati, A.M., 2012.  
2 Interleukin-1 $\beta$  causes fluoxetine resistance in an animal model of epilepsy-associated  
3 depression. *Neurotherapeutics*.9, 477-85.  
4  
5

6  
7  
8 Ramirez, K., Shea, D.T., McKim, D.B., Reader, B.F., Sheridan, J.F., 2015. Imipramine  
9 attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social  
10 avoidance. *Brain Behav Immun*.46,212-20.  
11  
12  
13

14  
15  
16 Ransohoff, R.M., Brown, M.A., 2012. Innate immunity in the central nervous system. *J*  
17 *Clin. Invest.* 122, 1164–1171.  
18  
19

20  
21  
22 Rao, N.P., Venkatasubramanian, G., Ravi, V., Kalmady, S., Cherian, A., Yc, J.R.,  
23 2015. Plasma cytokine abnormalities in drug-naïve, comorbidity-free obsessive-  
24 compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 229, 949-52.  
25  
26  
27

28  
29  
30 Rawdin, B.S., Mellon, S.H., Dhabhar, F.S., Epel, E.S., Puterman, E., Su, Y., Burke,  
31 H.M., Reus, V.I., Rosser, R., Hamilton, S.P., Nelson, J.C., Wolkowitz, O.M., 2012.  
32 Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression.  
33 *Brain Behav Immun.* S0889-1591, 00497-7.  
34  
35  
36

37  
38  
39 Réus, G.Z., Jansen, K., Titus, S., Carvalho, A.F., Gabbay, V., Quevedo, J., 2015.  
40 Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression:  
41 Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* 68, 316-28.  
42  
43  
44

45  
46  
47 Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., Schmoldt, A., 2012. Therapeutic and  
48 toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care.* 16,  
49 R136.  
50  
51  
52

53  
54  
55 Schmidt, H.D., Shelton, R.C., Duman, R.S., 2011. Functional biomarkers of depression:  
56 diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology.* 36, 2375–2394.  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Thase, M.E., 2006. Preventing relapse and recurrence of depression: a brief review of  
2 therapeutic options. *CNS Spectr.* 11, 12–21.  
3

4  
5 Wang, Y., Cui, X.L., Liu, Y.F., Gao, F., Wei, D., Li, X.W., Wang, H.N., Tan, Q.R.,  
6  
7 Jiang, W., 2011. LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and  
8 hippocampal neurogenesis in rats. *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry.* 35,  
9 1831-5.  
10

11  
12 Zhang, Y., Liu, L., Peng, Y.L., Liu, Y.Z., Wu, T.Y., Shen, X.L., Zhou, J.R., Sun, D.Y.,  
13  
14 Huang, A.J., Wang, X., Wang, Y.X., Jiang, C.L., 2013. Involvement of Inflammasome  
15  
16 Activation in Lipopolysaccharide-induced Mice Depressive-like Behaviors. *CNS*  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 1.**Characteristic of the selected patients.

Parameter	Controls	MDD
Age (years)	45.5 ± 6.1	46.1 ± 8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 2.5	22.9 ± 1.2
Sex (male/female)	5/15	50/164
Months under treatment	---	7.1 ± 1.2
IL-1β	3.2 ± 2.5	22.9 ± 1.2
IL-18	2.7 ± 1.5	26.6 ± 8.3

## Figures

**Figure 1. Molecular structure of theselected antidepressants.**

**Figure 2. Effect of antidepressants in IL-1 $\beta$  and IL-18 medium release.** A. IL-1 $\beta$  levels were determined in THP-1 after 12h treatment with 5mM ATP in the presence or absence of 1 $\mu$ M of the different antidepressants. B. IL-18 levels were determined in THP-1 after 12h treatment with 5mM ATP in the presence or absence of 1 $\mu$ M of the different antidepressants determined by ELISA as described in Material and methods. Data represent the mean $\pm$ SD of three separate experiments. \* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  between ATP and antidepressants treatment.

**Figure 3. Effect of antidepressants in the NLRP3-Inflammasome activation.**

A. NLRP3 protein expression levels were determined in THP-1 after 12h treatment with 5mM ATP in the presence or absence of 1 $\mu$ M of the different antidepressants. B. Quantification of active IL-1 $\beta$  (p17) protein levels. Data represent the mean $\pm$ SD of three separate experiments. \* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  between ATP and antidepressants treatment.

**Figure 4. Effect of antidepressants in mice prevents RS-induced depressive behaviors.** A. Mean immobility time. B. IL-1 $\beta$  serum levels. The results are all shown as the mean $\pm$ SD. \* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  between stress group and antidepressants (N=10 for each group).

**Figure 5. Effect of antidepressants in the inflammasome activation of MDD patients.**

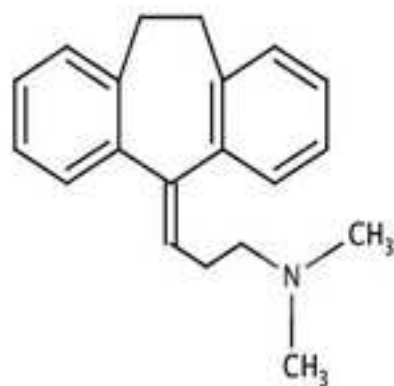
A and B. IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in serum from non-treated and treated MDD patients were determined by ELISA as described in Material and methods. C. NLRP3 transcript expression levels relative to  $\beta$ -actin were determined by real-time quantitative RT-PCR as described in Material and methods. Data represent the mean $\pm$ SD of three separate



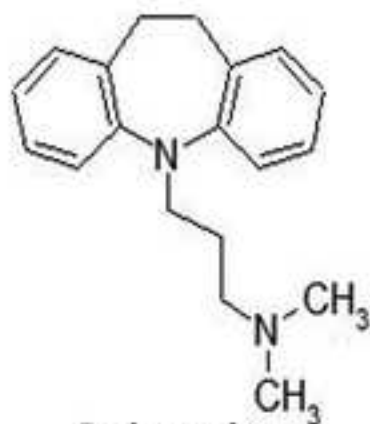
experiments.  $^*p < 0.001$  and  $^{**}p < 0.01$  between non treated and antidepressants treatment. **D.** Correlation of IL-1 $\beta$  in serum from MDD patients with serotonin serum levels. The correlation was established by calculating correlation coefficients.

Figure(s)

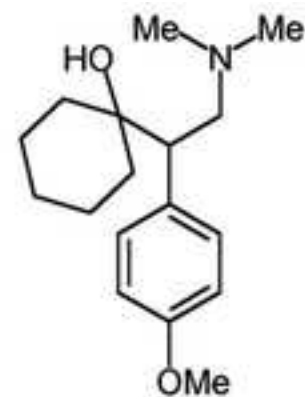
[Click here to download high resolution image](#)



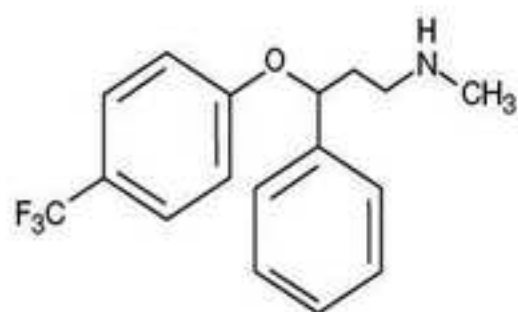
Amitriptyline



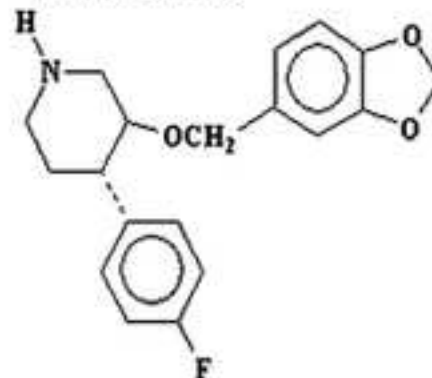
Imipramine



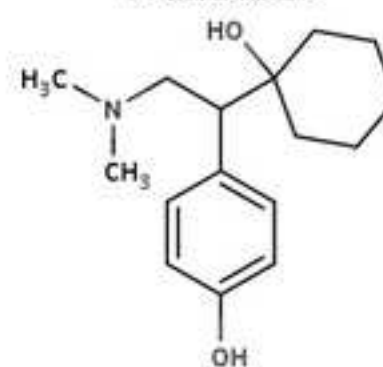
Venlafaxine



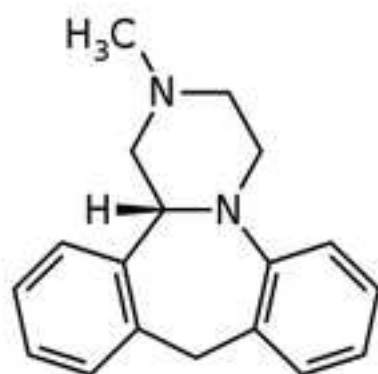
Fluoxetine



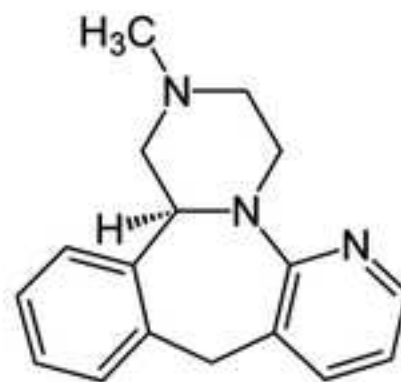
Paroxetine



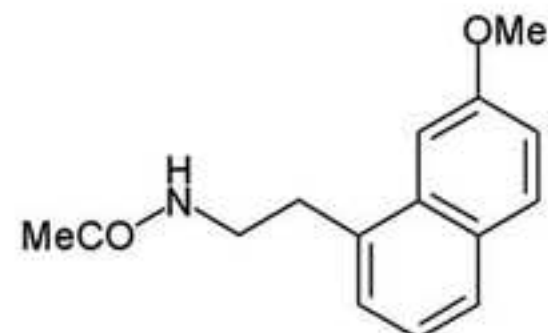
Desvenlafaxine



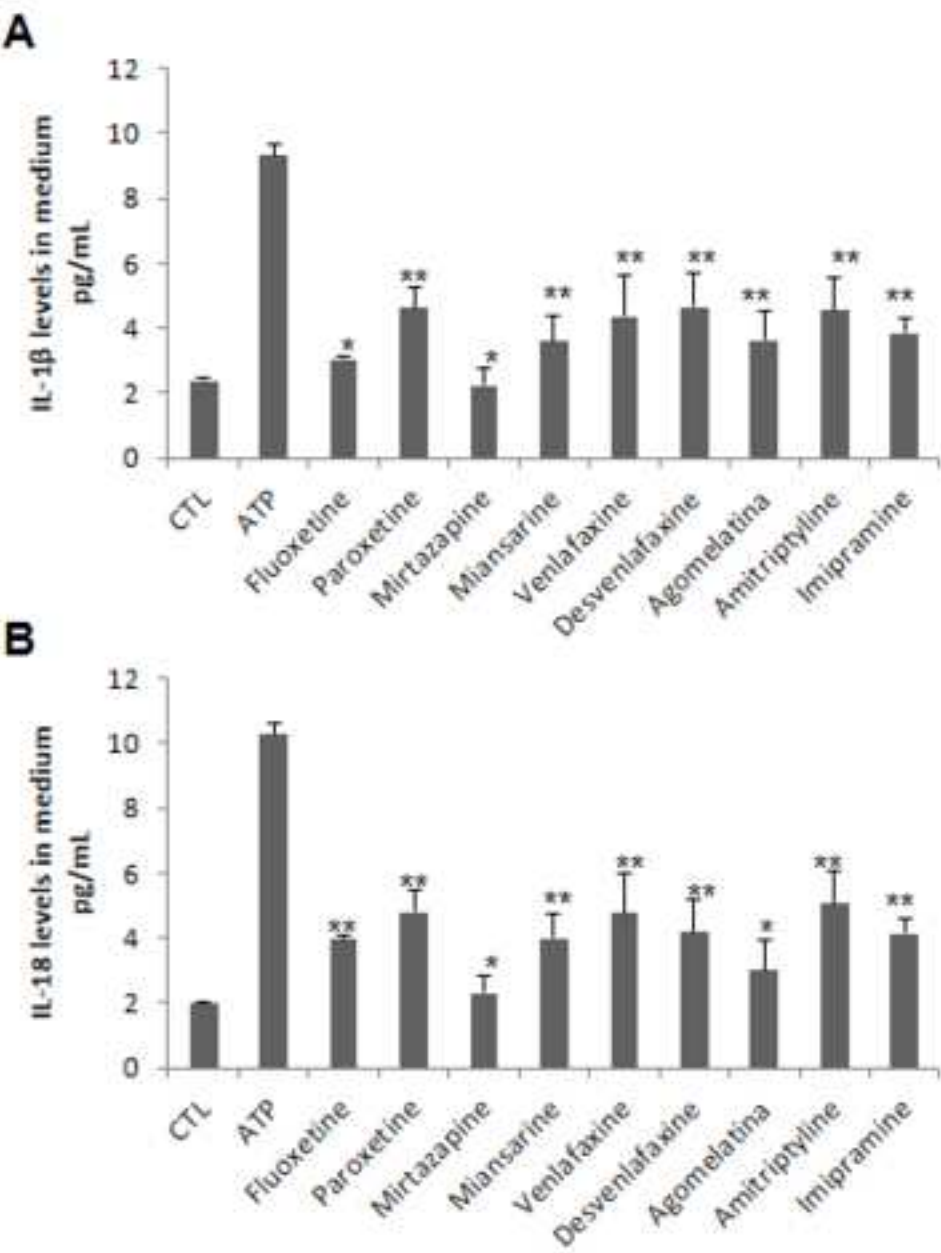
Mianserin



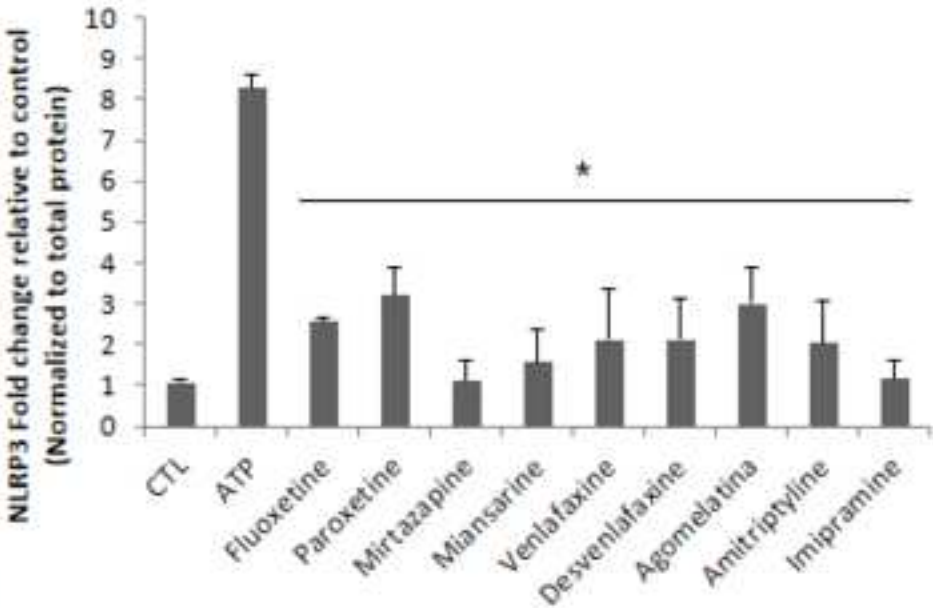
Mirtazapin



Agomelatine



**A**



**B**

